



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



Université de Larbi Tébessi Tébessa

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

Département de biologie Appliquée

## MEMOIRE DE MASTER

Domaine: Sciences de la nature et de la vie

Filière: Science biologique

Spécialité: Toxicologie xénobiotiques et risques toxicologique

Thème

# Etude de l'effet du *Thymus numidicus* sur la néphrotoxicité induite par l'alloxane chez la souris

Présenté par :

NECIB Linda

Devant le jury:

BOUKAZOULA Fatima	M.A.A	U.L.T. Tébessa	Président
BOUSSEKINE Samira	M.C.B	U.L.T. Tébessa	Rapporteur
ROUABHI Rachid	Prof	U.L.T. Tébessa	Examineur

Date de soutenance: 30 Mai 2016

Année universitaire

**2015/2016**

الهدف من هذا العمل هو دراسة وتقييم الفعالية المضادة للأكسدة لـ *Thymus numidicus* في الوقاية من الإجهاد التأكسدي الناتج عن مادة الألوكسان، حيث تم استخدام هذا المركب في مجال الصيدلة إلى غاية 1943.

- حقن مادة الألوكسان سبب خلافا في عملية الأيض ترجمت على شكل تغيير في المعايير البيوكيميائية في الدم والأنسجة (النسيج الكلوي) وهذا يعني:
- زيادة في تركيز الكرياتينين، اليوريا في المصل.
- انخفاض المغنيزيوم والبروتينات الكلية.
- انخفاض نسبة الغلوتاثيون المختزل (GSA) في النسيج الكلوي.
- انخفاض النشاط الإنزيمي للغلوتاثيون المؤكسد، (GPx) والكتلاز.
- زيادة في النشاط الإنزيمي بالنسبة للغلوتاثيون الناقل (GST).
- زيادة في كمية مؤشر الأكسدة الليبيدية (MDA) على مستوى الكلى.
- معالجة الفئران المحقونة مسبقا بمادة الألوكسان بـ (TN)، 30 و 50 ملغ/كغ/يوم 01. مدة 21 يوما أدى إلى تحسين المعايير الوظيفية للكلى، كما أدى أيضا إلى تحسين نشاط الأنزيمات المضادة للأكسدة.

وهذه النتيجة توحي أن هذا التأثير المضاد للأكسدة، لهذه النبتة يمكن ان يقلل من الإجهاد التأكسدي.

#### الكلمات المفتاحية:

*Thymus numidicus*، الإجهاد التأكسدي، الألوكسان، المعايير البيوكيميائية، مضاد الأكسدة.

The aim of this work is to study and evaluate the effect of *Thymus numidicus* antioxidants in the prevention of oxidative stress, resulted from alloxane substance, which is an organic substance used in the field of pharmacy until 1943.

Injection of alloxane causes an imbalance in metabolism, which is translated in biochemical changes standards in blood and tissue (kidney tissue).and that means:

- An increase in the concentration of creatinine, urée in the serum.
- Low in the magnesium and renal proteins.
- Low GSH in kidney tissue.
- Low the enzymatic activity (GPx) and catalase.
- Increase in the content of MDA at the kidney tissue level.
- Increase in the enzymatic activity for the GST.

The results shows that the treatment of mice injected pre-textured alloxane with *Thymus numidicus* (30 and 50 mg/kg/day) for 21 days led to improve the occupational standards for the kidneys. It also led to improved activity of enzymes antioxidants and this result suggests that this effect counter to this plant can reduce oxidative stress.

**Key words:**

*Thymus numidicus*, Oxidative stress, Alloxane, Biochemical parameters, Antioxidant.

L'objectif de ce travail est d'étudier et d'évaluer l'effet antioxydant du *Thymus numidicus* sur la prévention du stress oxydatif induit par l'alloxane qui est un composé organique utilisé dans le domaine de la pharmacie jusqu'en 1943.

L'injection de l'alloxane a provoqué également une perturbation du métabolisme qui se traduit par une modification des paramètres biochimiques sanguins et tissulaires ( tissu rénal) à savoir :

- Une augmentation la concentration sérique de l'urée, la créatinine;
- Une diminution de la magnésémie et les protéines totales;
- Une diminution de la teneur du tissu rénal en glutathion réduit (GSH);
- Une diminution de l'activité enzymatique de la glutathion peroxydase (GPx), la catalase (CAT);
- Une augmentation de l'activité enzymatique de la glutathion -S-transférase (GST);
- Une augmentation de la teneur du tissu rénal en malondialdéhyde (MDA).

Le traitement des souris alloxaniques par le *Thymus numidicus* à une dose de 30 et 50 mg/kg/j pendant 21 jours a amélioré les paramètres de la fonction rénale, ainsi que les paramètres de la défense anti oxydante.

Ces résultats inspire un effet antioxydant de *Thymus numidicus* qui peut atténuer le stress oxydatif.

**Mots clés:** *Thymus numidicus*, Stress oxydant ,alloxane, Paramètres biochimiques, Antioxydant.



## Remerciement

*Avant tous, nous remercions «Allah» pour tous ces dons.*

*Nous adressons nos plus sincères remerciements à «Mme Boussekine samira» ma promotrice de mémoire, que je remercie pour l'aide, le soutien et la Disponibilité.*

*Un très grande merci à, Pr.Rouabhi R., professeur à l'université de Tébessa, pour avoir accepté d'examiner ce mémoire et de faire partie du jury de cette soutenance*

*Merci monsieur.*

*Un très grand merci à Mme. Boukezoula Fatima., pour m'avoir fait l'honneur de présider le jury.*

*Merci bien*

*Nous remercions tout particulièrement les enseignants qui ont contribués A notre formation durant l'année théorique surtout.*

*En fin, nous tenons à remercier ceux qui ont contribués de près ou de loin à la réalisation de ce travail et à tous nos collègues de master : T.X.R.T*



## Dédicace

A mes très chers parents qu'ils trouvent ici toute ma gratitude pour leur Soutien  
tout Au long de mes études.

A mes chers frères et sœurs.

A tous Mes amies et mes collègues

Je dédie ce modeste travail.

**Linda**

### Table des matières

ملخص

Abstract

Résumé

Remerciement

Dédicace

Tables des matières

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des Symboles

Introduction

### Première partie: Recherche bibliographiques

I. L'alloxane	02
1. Définition	02
2. Historique	02
3. Mode d'action	03
II. Stress oxydant et les systèmes des défenses	06
1. Définition	06
1.1. Stress oxydant	06
1.2. Radicaux libres	06
2. Origines des radicaux libres	06
3. Type des radicaux libres	08
3.1. Espèces réactives de l'oxygène	08
3.2. Espèces réactives de l'azote	09
4. Conséquences du stress oxydant	09
4.1. La peroxydation lipidique	10
4.2. L'oxydation de l'ADN	11
4.3. Oxydation des protéines	12
5. Biomarqueurs du stress oxydant	12
5.1. Marqueurs de l'oxydation des lipides	13
a- Malondialdéhyde (MDA)	13
b- Le pentane	13
c- F1-Isoprostanés	13

d- hydroxynonéal (4-HNE)	13
e- 4-oxo-nonéal (ONE)	13
5.2. Marqueurs de l'oxydation des protéines	14
5.3. Marqueurs de l'oxydation de l'ADN	14
6. Systèmes antioxydants	15
6.1. Système antioxydant enzymatique	15
6.1.1. Superoxyde dismutases (SOD)	15
6.1.2. Catalase (CAT)	15
6.1.3. La glutathion peroxydase séléno-dépendante (GPx)	15
6.1.4. La glutathion réductase (GR)	16
6.1.5. Glutathion S-transférase (GST)	16
6.1.6. La thiorédoxine (TRX)	16
6.1.7. Hèmes oxygénase	16
6.1.8. Peroxyredoxines (PRX)	16
6.1.9. La NAD(P) H quinone oxydoréductase 1	16
6.1.10. Les paraoxonases (PON)	17
6.2. Les systèmes antioxydants non enzymatiques	17
6.2.1. Molécules anti-oxydantes endogènes	17
a- Le glutathion	17
b- Ubiquinol et cytochrome c	17
c- Les métallothionéines	17
d-Acide urique	18
e-Bilirubine	18
f-Mélatonine	18
g- Glucose et mannitol	18
6.2.2. Molécules anti-oxydantes exogènes	18
a-Vitamine E et Vitamine C	18
b- $\beta$ -carotène	18
c-Oligoéléments	19
d-Polyphénols	19
III. <i>Tymus numidicus</i>	19
1. Présentation de la famille des <i>Lamiacées</i>	19
2. Le genre <i>thymus</i>	19



2.1. Origine du nom	19
2.2. Historique de l'utilisation du thym en phytothérapie	20
2.3. Distribution géographique	20
2.4. Classification de chimiotypes des thym	21
2.5. Principes actifs du <i>Thym</i>	23
2.6. Propriétés thérapeutiques de cette plante	23
3. <i>Thymus numidicus</i>	23
3.1. Place dans la systématique	24
3.2. Description botanique	24
3.3. Composition de l'huile essentielle du <i>Tymus numidicus</i>	25
3.4. Propriétés thérapeutiques de cette plante	25
<b>Partie expérimentales</b>	
I. Matériels	26
a. Animaux	26
b. Protocole	26
1. Conditions d'élevage	26
2. Traitement des souris	26
3. Sacrifices des souris et récupération du sang et des reins	27
c. Paramètres analysés et méthodes	30
1. Paramètres métaboliques	30
1.1. Dosage d'urée sanguine	30
1.2. Dosage de la créatinine	31
1.3. Dosage des protéines Totales	31
1.4 Magnésium	32
2. Paramètres enzymatiques	32
2.1. Préparation de l'homogénat pour le dosage des paramètres du stress oxydatif	32
2.2. Dosage du glutathion	32
2.3. Dosage de l'activité enzymatique de la glutathion peroxydase (GPx)	33
2.4. Dosage de l'activité enzymatique de la glutathion S-Transférase(GST)	34
2.5. Dosage des protéines tissulaire	35
2.6. Dosage de catalase	36
2.7. Dosage du malondialdéhyde	37
d. Etude statistiques	38

II. Résultats	39
2.1. Etude du poids corporel et poids relatif des reins	39
2.1.1. Poids corporel	39
2.1.2. Poids relatif des reins	40
2.2. Etude des paramètres biochimiques	42
2. 2.1 Urée et créatinine sanguines	42
2.2.2. Protéines totales	44
2.2.3. Magnésium sanguin	44
2.3. Etude des paramètres du stress oxydant	46
2.3.1. Glutathion réduit (GSH)	46
2.3.2. Activité enzymatique de la glutathion peroxydase (GPx)	47
2.3.3. Glutathion - S- transférase (GST)	48
2.3.4. Catalase	48
2.3.5. Malondialdéhyde (MDA)	49

### Discussions

1. Effet du <i>thymus numidicus</i> sur le poids corporel et le poids relatif des reins	51
2. Effet du <i>thymus numidicus</i> sur les paramètres biochimiques sanguins	52
3. Effet du <i>thymus numidicus</i> sur les paramètres biochimiques tissulaires	53

Conclusion

Référence bibliographiques

Annexes

**Liste des figures**

N° Figure	Titre	Page
<b>01</b>	Formules chimiques de l'Alloxane, l'acide dialurique et butyl-alloxane	<b>03</b>
<b>02</b>	Réactions redox cyclables entre l'acide dialurique et l'alloxane	<b>04</b>
<b>03</b>	Le mécanisme de la production d'espèces réactives de l'oxygène induite par l'alloxane dans les cellules $\beta$ de pancréas de rat	<b>05</b>
<b>04</b>	Origines des radicaux libres	<b>07</b>
<b>05</b>	Origine des différents radicaux libres oxygénés et nitrogénés	<b>08</b>
<b>06</b>	Activité de la NO synthase endothéliale et formation du peroxyxynitrite	<b>08</b>
<b>07</b>	Mécanisme en chaîne de la peroxydation des acides gras polyinsaturés et nature des produits terminaux formés	<b>11</b>
<b>08</b>	Nature de quelques modifications des chaînes latérales, d'acides aminés des protéines après attaque radicalaire	<b>12</b>
<b>09</b>	Produits terminaux de la peroxydation lipidique	<b>14</b>
<b>10</b>	<i>Tymus numidicus</i> Poiret	<b>20</b>
<b>11</b>	Conditions d'élevage des Souris	<b>26</b>
<b>12</b>	Le sacrifice de souris	<b>27</b>
<b>13</b>	Prélèvement des reins	<b>28</b>
<b>14</b>	Schéma récapitulatif du protocole expérimental	<b>29</b>
<b>15</b>	Réaction du dialdéhyde malonique avec l'acide thiobarbiturique corporel) des reins chez les souris témoins et traités après 21 jours de traitement	<b>37</b>
<b>16</b>	Evolution du poids corporel des souris témoins et des souris traitées pendant 21 jours de traitement.	<b>40</b>
<b>17</b>	Evolution du poids relatif des reins (g/100g PC) chez les souris témoins et traités après 21 jours du traitement.	<b>41</b>
<b>18</b>	Variation de la concentration sérique de la créatinine chez les souris témoins et traités après 21 jours de traitement.	<b>43</b>
<b>19</b>	Variation de la concentration sérique de l'urée chez les souris témoins et traités après 21 jours de traitement	<b>43</b>
<b>20</b>	Variation de la concentration sérique en protéines totales (g/l) chez les souris témoins et traités après 21 jours de traitement	<b>44</b>

## Liste des figures

<b>21</b>	Variation du taux de magnésium sérique chez le lot témoin et les lots traités après 21 jours de traitement	<b>45</b>
<b>22</b>	Variation du glutathion (nmol/mg de prot) dans les tissus rénal chez les souris témoins et traitées après 21 jours de traitement	<b>47</b>
<b>23</b>	Variation de l'activité enzymatique de la glutathion peroxydase ( $\mu\text{mol} / \text{mg prot}$ ) dans le tissus rénales chez les souris témoins et traitées après 21 jours de traitement	<b>47</b>
<b>24</b>	Variation de l'activité enzymatique de la glutathion –S-transférase (nmol/min/mg de prot) dans les tissus rénales chez les souris témoins et traitées après 10 jours de traitement.	<b>48</b>
<b>25</b>	Variation de Malon dialdéhyde (nmol/mg prot) dans les tissus rénal chez les souris témoins et traités après 21 jours de traitement	<b>49</b>
<b>26</b>	Variation de l'activité de la catalase rénal ( $\mu\text{mol} / \text{min/mg prot}$ ) chez les souris témoins et traités après 21 jours de traitement	<b>50</b>

**Liste des tableaux**

<b>N° Tableau</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
<b>01</b>	Répartition géographique en Algérie	<b>21</b>
<b>02</b>	Place dans la systématique	<b>24</b>
<b>03</b>	Mode opératoire	<b>31</b>
<b>04</b>	Variation du poids corporel PC (g) et du poids relatif PR (g/100g de poids	<b>39</b>
<b>05</b>	Variation de la concentration sérique de l'urée, la créatinine, les protéines totales et le magnésium chez le lot témoin et les lots traités après 21 jours de traitement	<b>42</b>
<b>06</b>	Variation du glutathion (GSH), Malon dialdéhyde (MDA), l'activité enzymatique de la glutathion peroxydase (GPx), glutathion -S- transférase (GST), catalase (CAT) dans le tissu rénal, chez les souris témoins et traitées après 21 jours de traitement.	<b>46</b>



### Liste des symboles

**4-HNE** :4-hydroxynonanal

**8-OH-dG** :8-hydroxy-2'-déoxyguanosine

**A** :alloxane

**ADN**: Acide désoxyribonucléique .

**ADP**: Adénosine Di Phosphate .

**BBC** : bleu brillant de coumassie

**BHT** : Butyl hydroxy toluene

**Ca<sub>2</sub><sup>+</sup>** : ion calcium

**CAT**: Catalase.

**CDNB**: 1-chloro, 2.4-dinitrobenzène

**CO** : monoxyde de carbone

**Cu** : Cuivre

**Cu/Zn-SOD** : Superoxyde dismutase aux ions cuivre et zinc

**DAO** : dérivés actifs de l'oxygène

**DTNB** :Acide 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoïque) ou reactif d'Ellman.

**DPPH** :2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl.

**Ec-SOD** : extracellulaire

**EDTA** : Ethylène diamine tétra-acétique acid

**EQ** : équation

**ERA** :espèces réactives d'azote

**ERO** :espèces réactives de l'oxygène

**Fd** : facteur de dilution

**Fe<sup>2+</sup>** : ions ferreux

**GPx** :Glutathion peroxydase

**GR**:La glutathion réductase

**GSH** :glutathion réduit

**GSSG** :glutathion oxydé

**GST** :Glutathion S-transférase

**H** :hydrogène

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**: Peroxyde d'hydrogène.

**HDL** Hight density lipoproteins (lipoprotéines de haute densité

**HO** :hème oxygénase

**J** :jour

**L** : litre

**M** :mole

**MDA** : Malondialdéhyde

**Mg** : milligramme

**Min** :minute

**Mn-SOD** Superoxyde dismutase associée au manganèse.

**NADPH** : Nicotinamide-adénine dinucléotide- phosphate réduit

**Nm** :nanomètre

**NO<sup>•</sup>** : nitroxyl

**NO** :Monoxyde d'azote

**NO<sup>+</sup>** :ion nitrosium

**NOS** :Monoxyde d'azote synthase

**NOS<sub>e</sub>** : NO synthase endothéliale

**O<sub>2</sub>** :Oxygène singulet.

**O<sub>2</sub><sup>•-</sup>** : l'anion superoxyde

**°C** : degré Celsius

**OH<sup>•</sup>** : Le Radical Hydroxyle.

**ONE**: 4-oxo-nonéanal

**ONOO<sup>-</sup>** : peroxydinitrite

**ONOOH** :Nitroperoxyde.

**PON** :Les paraoxonases

**PON1** :paraoxonase/arylesterase-1

**PON2** :paraoxonase/arylesterase-2

**PON3** :paraoxonase/lactonase-3

**PRX** :Peroxyredoxines

**R<sup>•</sup>** :radical d'acide gras

**ROO<sup>•</sup>** :radical peroxyde

**ROOH** :hydroperoxyde lipidique

**SH** :groupement thiol

**SOD** : Superoxyde dismutase.

**SOH** :acide sulfénique

**SSA** :acide sulfosalicylique

**STZ**: Streptozotocine

**TBA** :acide thiobarbiturique

**TCA** : Trichloroacétique

**TN** : thymus numidicus

**TP** : tampon phosphate

**X(mg/ml)** : concentration de l'extrait en protéines

**Zn**: zinc

**μ mol**: Micromoles

# Introduction

### Introduction

Depuis quelques années, le monde des sciences biologiques et médicales s'intéresse beaucoup au concept de stress oxydatif parfois appelé stress oxydant, se définit comme étant un déséquilibre de la balance oxydants-antioxydants en faveur des oxydants. (**Atamer et al., 2008**). Il se développe lorsque les radicaux libres, sont produits plus rapidement qu'ils ne peuvent être neutralisés par l'organisme. Un radical libre est une molécule très réactive contenant un ou plusieurs électrons non paires dans ses orbitales (**Mette, Berger., 2006**) et provoquent des altérations des protéines, lipides et acides nucléiques (**Mette, Berger., 1997**).

Heureusement les organismes possèdent des moyens de lutte intrinsèques contre ces radicaux libre, et cet équilibre cellulaire redox peut être rompu. D'où la nécessité de renforcer le système anti oxydant par des molécules anti oxydantes exogènes d'origines animales ou végétales.

Plusieurs recherches s'orientent vers les plantes médicinales considérées comme source énorme de multiples substances phytothérapeutiques douées d'activités antioxydantes et qui peuvent être l'arme permettant de faire face au stress oxydant et ses dégâts au niveau des organes de l'être vivant.

Au cours de notre recherche on va utiliser, une plante utilisée dans la médecine traditionnelle, c'est le *Thymus numidicus*.

Notre recherche est consacrée à l'étude de l'effet de *Thymus numidicus* sur les paramètres biochimiques sériques et tissulaires (tissu rénal) chez les souris.

Partant de ce constat, l'idée originale de notre travail était d'étudier et d'évaluer, chez des souris de la souche BALB/C suite à l'injection de l'alloxane, l'effet du *Thymus numidicus* sur la toxicité rénale induite par ce dernier.



# **Recherche bibliographiques**

### I. L'alloxane

#### 1. Définition

L'alloxane ou (2, 4, 5, 6-tetraoxypyrimidine, 5, 6-dioxyuracil) : est un composé organique basé sur un squelette de l'hétérocyclique de la pyrimidine (**Bouhouche., 2014**), hydrophile et instable. Sa demi-vie à pH neutre et à 37 ° C est d'environ 1,5 min et est plus à des températures inférieures (**Szkudelski., 2001; Nermeen. et al; 2010**).

L'alloxane est le produit résultant de l'oxydation de l'acide urique par l'acide nitrique. Il est utilisé sous forme d'injections pour induire expérimentalement un diabète de type 1 (**Xuemei. et al., 2007; Fatmi., 2014**).

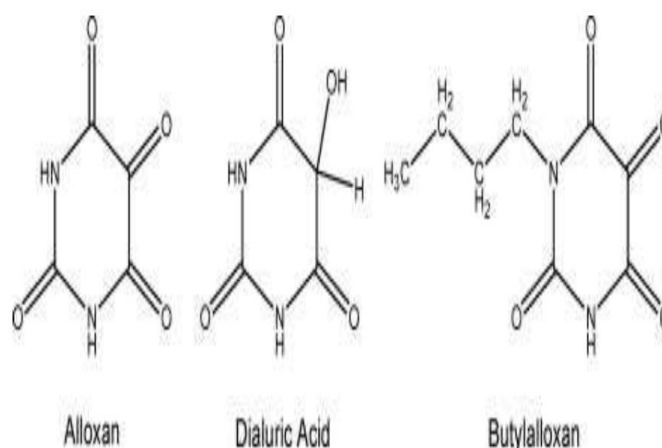
#### 2. Historique

Alloxane découvre en 1818 par Gaspard Brugnatelli (**Szkudelski., 2001**).

Brugnatelli a obtenu une substance à partir de l'oxydation de l'acide urique qu'il nommé *ossieritrico*. Ce nom, du grec «à faire rouge», fait référence à la propriété de la substance pour colorer la peau une couleur rouge caractéristique.

Vingt ans plus tard, les chimistes allemands, Wöhler et Liebig, ont étudié l'oxydation de l'acide urique avec détail et ont obtenu le même composé, qu'ils ont appelé alloxane. Le nom alloxane issu de la fusion de deux mots, à savoir, allantoïne et acide oxalurique. L'allantoïne est un produit de l'acide urique excrété par le fœtus dans l'allantoïde et l'acide oxalurique est dérivé de l'acide oxalique et l'urée qui se trouve dans l'urine.

L'alloxane resté uniquement dans le domaine de la pharmacie jusqu'en 1943, lorsque Dunn et all., ont signalé que cette substance provoque une nécrose des îlots pancréatiques lorsqu'il est administré à des lapins ou des rats (**Bouhouche., 2014**).



**Figure 01:** Formules chimiques de l'Alloxane, l'acide dialurique et butyl-alloxane (Lunzen., 2012).

### 3. Mode d'action

L'action de l'alloxane sur les enzymes peut se manifester par l'inactivation des cofacteurs ou par compétition avec les substrats des coenzymes respectives grâce à l'analogie structurale (Anderson et Stitt., 1993).

L'alloxane pénètre à travers les transporteurs de glucose GLUT2 des cellules  $\beta$  pancréatiques. Au cytosol, l'Alloxane est réduit en acide dialurique. ( Szkudelski., 2001).

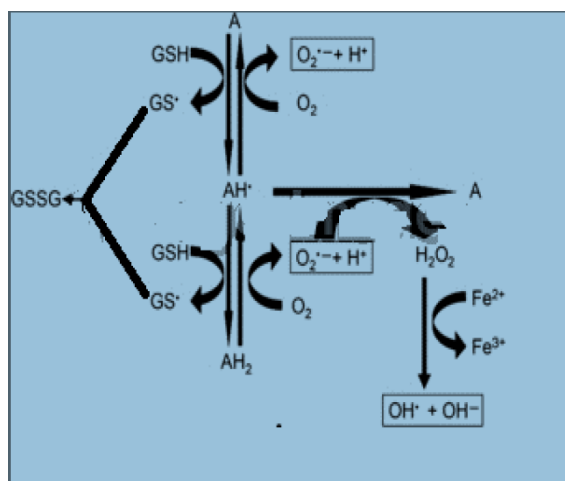
Cette réduction est assurée par plusieurs agents tels que le glutathion réduit, la cystéine, l'acide ascorbique et les groupements SH des protéines. L'alloxane se relie avec deux groupements thiol du site actif de la glucokinase formant un pont disulfure et inactivant l'enzyme, l'acide dialurique formé est ré-oxydé en alloxane, ce qui génère des espèces réactives oxygénées et active à la réaction de Fenton.( Szkudelski., 2001; Medjdoub., 2013), associé à l'internalisation de fortes doses de calcium dans le cytosol provoquant ainsi la destruction rapide des cellules  $\beta$  (Ammon *et al.*, 1983; Lenzen *et al.*, 1996).

Cet effet délétère est inhérent à la vulnérabilité de ces cellules au stress oxydatif en raison d'une part, de leur pauvreté en  $\text{Cu}^{++}/\text{Zn}^{++}$  super oxyde dismutase, en catalase et en glutathion peroxydase, d'autre part au faible contenu en glutathion réduit (Grankvist *et al.*, 1981). cette fragilité intervient dans les mécanismes qui conduisent à la destruction des cellules  $\beta$  sous l'effet d'agents diabétogènes comme l'Alloxane.(Grankvist *et al.*, 1981; Ammon *et al.*, 1983; Lenzen *et al.*, 1996).

L'alloxane a un groupe 5 carbonyle central qui réagit très avidement avec des groupes thiol. La glucokinase est l'enzyme thiol le plus sensible de la cellule  $\beta$ . À des concentrations élevées, l'alloxane peut inhiber nombreuses enzymes fonctionnellement importants, ainsi que d'autres protéines et fonctions cellulaires (Bouhouche., 2014).

Le glutathion réduit (GSH), la cystéine et des groupes sulfhydryle liés aux protéines sont très sensibles à l'action de la réduction de l'alloxane en acide dialurique, (Nermeen *et al.*; 2010). L'action des radicaux hydroxyyles après le traitement par l'alloxane a été démontrée *In vitro* et *In vivo* (Szkudelski., 2001).

L'alloxane est pourvu d'un pouvoir producteur du peroxyde d'hydrogène et d'autres radicaux libres qui sont à l'origine de cette nécrose cellulaire des cellules  $\beta$  (Kebièche *et al.*, 2001).



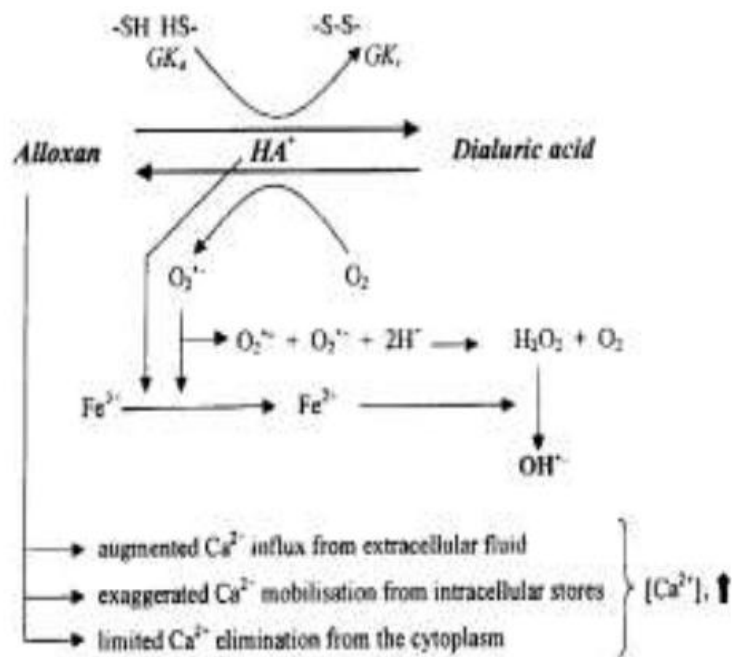
**Figure 02:** Réactions redox cyclables entre l'acide dialurique et l'alloxane (Bouhouche., 2014).

L'effet des espèces réactives de l'oxygène obtenu à partir d'alloxane sur l'ADN est un autre mode d'action qui induit une défragmentation de l'ADN. Cette fragmentation cause des dommages sur ce dernier, qui stimule la poly ADP- ribosylation, un processus participant à la réparation de l'ADN. Les antioxydants comme le superoxyde dismutase, la catalase et les piègeurs de radicaux hydroxyyles non enzymatiques ont été trouvés pour se protéger contre la toxicité de l'alloxane (Szkudelski., 2001; Nermeen *et al.*, 2010; Bouhouche., 2014; Medjdoub., 2013).

Cette substance toxique diminue le taux de l'hormone de croissance au niveau de l'adénohypophyse (**Medjdoub., 2013**).

En outre, la perturbation de l'homéostasie de calcium intracellulaire, est à l'origine de l'effet diabétogène de l'alloxane. L'alloxane provoque une augmentation du  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique des cellules  $\beta$  pancréatique. Conduisant à des dommages des ces cellules (**Szkudelski., 2001**).

L'alloxane a été proposé d'agir comme un agent diabétogène en raison de sa capacité à détruire les cellules des îlots de Langerhans (**Kebièche et al., 2001**).



**Figure 03:** Mécanisme de la production d'espèces réactives de l'oxygène induite par l'alloxane dans les cellules  $\beta$  de pancréas de rat (**Szkudelski., 2001**).



## II. Stress oxydant et les systèmes des défenses

### 1. Définition

#### 1.1. Stress oxydant

Le stress oxydant se définit classiquement comme un déséquilibre de la balance entre les systèmes prooxydants et les systèmes de défenses antioxydants en faveur des premiers, et source d'effets toxiques potentiels (**Laurent *et al.*, 1997; Favier., 2003**).

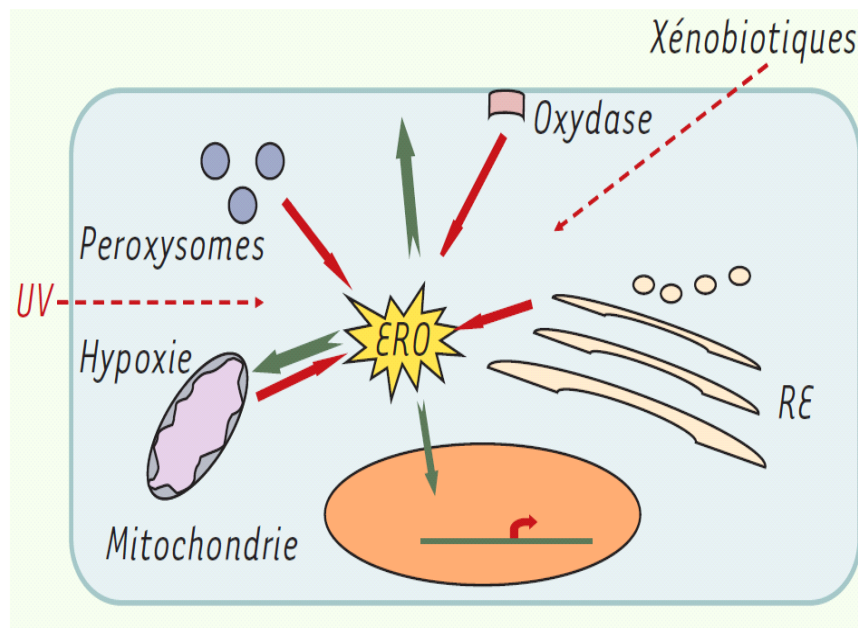
#### 1.2. Radicaux libres

Les radicaux libres sont des atomes ou des molécules portant un, ou plusieurs électrons célibataires (électron non apparié) sur leur couche externe et capables d'existence indépendante (**Halliwell et Gutteridge., 1989**). Ils peuvent être dérivés de l'oxygène (espèces réactives de l'oxygène ERO) ou d'autres atomes comme l'azote (espèces réactives d'azote ERA). La présence d'un électron célibataire confère aux radicaux libres une grande réactivité (demi-vie courte) et ils peuvent être aussi bien des espèces oxydantes que réductrices. De part sa structure particulière, il a tendance à attirer les électrons d'autres atomes et molécules pour gagner en stabilité (**Delattre *et al.* 2005**).

### 2. Origines des radicaux libres

Les radicaux libres peuvent être d'origine exogène: la source exogène principale des radicaux libres est la fumée de cigarettes et à un degré moindre la pollution environnementale (**Léophonte *et al.*, 2006**), et peuvent être produites par des agents physiques comme les rayonnements (**Robert., 2006**), et aussi Les métaux toxiques, génèrent des radicaux hydroxyles, très réactifs, à partir de l'espèce peu réactive  $H_2O_2$  (**Favier., 2003**). Lorsqu'ils sont d'origine endogène :des réactions chimiques et surtout enzymatiques. En effet, toute réaction impliquant de l' $O_2$  et un système réducteur de transfert d'électrons est susceptible de libérer des ERO. C'est ainsi que la chaîne respiratoire provoque une libération importante d'ERO (**Robert., 2006**), les radicaux libre elles sont produites en permanence par les cellules notamment au niveau des mitochondries, dans les cellules endothéliales par activation de la xanthine oxydase, en cas d'acidose, lors de l'inflammation par la NAPHoxydase et la myéloperoxydase, lors de l'auto-oxydation des catécholamines, lors de perturbations du métabolisme du calcium (**Groussard., 2006; Favier., 2003**). La source endogène provient en majorité des polynucléaires neutrophiles et des macrophages (**Léophonte *et al.*, 2006**) enfin la NO synthase endothéliale (NOS<sub>e</sub>), source de  $\bullet NO$  (**Beaudeau *et al.*, 2006**).

La production de radicaux libres est largement physiologique. Parmi les exemples la phagocytose, et 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, à la régulation des gènes, phénomène appelé contrôle redox des gènes (Favier., 2003).



**Figure 04:** Origines des radicaux libres. (Robert., 2006)

### 3. Type des radicaux libres

#### 3.1. Espèces réactives de l'oxygène

Les "espèces réactives de l'oxygène" : sont des dérivés de l'oxygène dont certains électrons se trouvent dans un état énergétique excité, donc très réactionnel; certains de ces dérivés portent un électron non apparié, Parmi les composés oxydants formés après réduction de l'oxygène

- Les radicaux libres primaires: ils jouent un rôle particulier en physiologie ils dérivent directement de l'O<sub>2</sub> par une réaction de réduction ; tels l'anion superoxyde O<sub>2</sub><sup>•-</sup> et le radical hydroxyle OH<sup>•</sup>;
- Les radicaux libres secondaires : ils sont formés par la réaction des radicaux libres primaires sur des composés biochimiques cellulaires;
- Les espèces actives de l'oxygène: ce sont des molécules ne possédant pas d'électron non apparié mais au fort pouvoir oxydant car elles peuvent donner naissance à des radicaux libres; comme l'oxygène singulet l'O<sub>2</sub>, le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ou le nitroperoxyde (ONOOH) (Favier., 2003; Pasquier., 1995 ; Haleng *et al.* , 2007) (Figure 05)

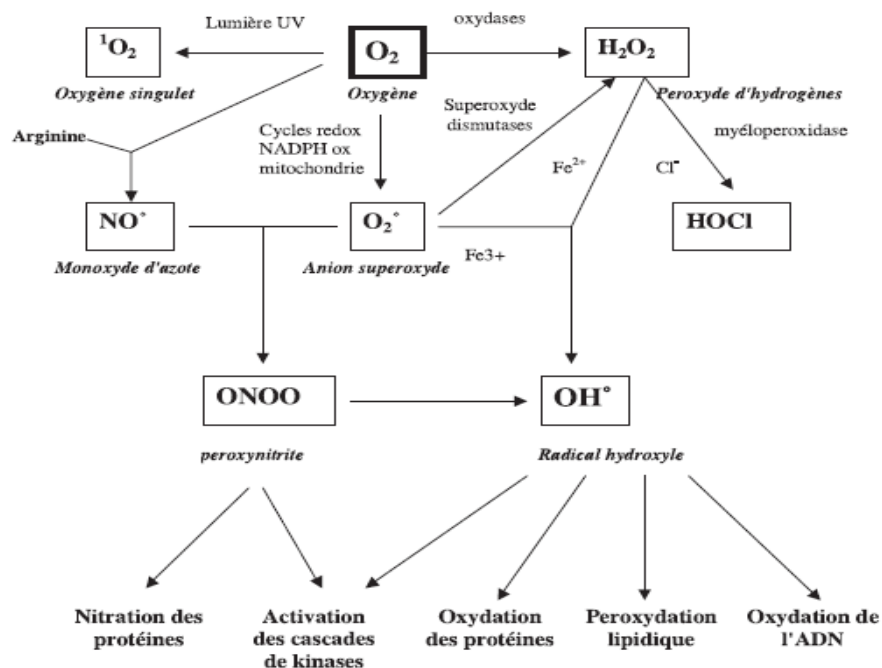
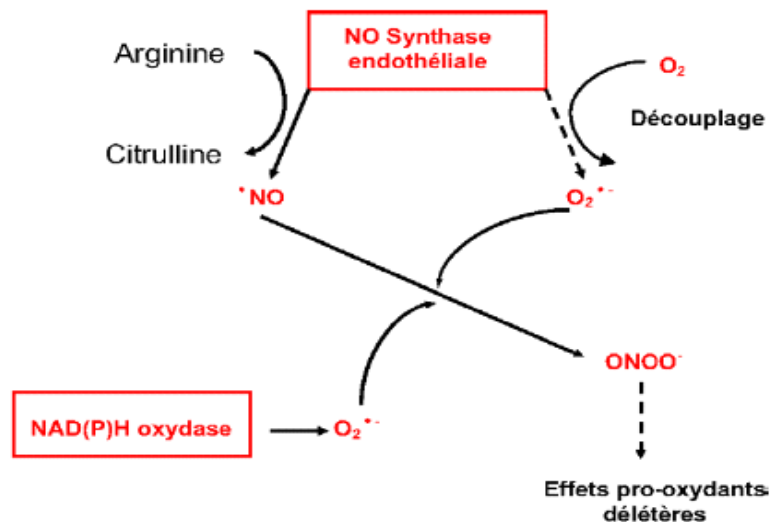


Figure 05: Origine des différents radicaux libres oxygénés et nitrogénés (Favier, 2003).

### 3.2. Espèces réactives de l'azote

Le monoxyde d'azote, NO<sup>•</sup> est produit au niveau cellulaire à partir d'arginine et d'oxygène. Cette réaction est catalysée par une famille d'enzymes : les NO synthases.

C'est une molécule labile très diffusible, dont les effets régulateurs s'exercent sur la plupart des fonctions physiologiques de l'organisme neurotransmission, fonctionnement rénal (Haleng *et al.* 2007), qui induit la relaxation des cellules musculaires lisses de la média. En situation physiologique, on observe une production basale de NO (Defraigne et Pincemail, 2007). Il existe trois types de NOS: la NOS neuronale, la NOS endothéliale et la NOS inductible présente dans de nombreux tissus et organes. Les deux premières sont constitutives ; leur activité est régulée par la concentration intracellulaire de calcium. Le NO<sup>•</sup> peut être converti en ion nitrosium (NO<sup>+</sup>), en anion nitroxyl (NO<sup>-</sup>) ou en peroxy-nitrite (ONOO<sup>-</sup>) (Clémentine, 2013) (Figure 06)



**Figure 06:** Activité de la NO synthase endothéliale et formation du peroxy-nitrite. (Beaudeau *et al.*, 2006).

### 4. Conséquences du stress oxydant

Les radicaux libres et autres groupes chimiques oxygénés réactifs entraînent l'oxydation des protéines, et les acides aminés, les lipides insaturés et l'ADN, conduisant à des altérations moléculaires potentiellement néfastes (Gabriel *et al.*, 2013).

#### **4.1. La peroxydation lipidique**

Les acides gras polyinsaturés sont les cibles privilégiées des ERO radicalaires en raison de leurs hydrogènes bis-allylique facilement oxydable. Plus l'acide gras est insaturé et plus il est susceptible d'être peroxydé, c'est-à-dire dégradé par un processus oxydant non enzymatique. Il s'agit d'un enchaînement de réactions radicalaires organisées en trois phases successives: l'initiation, la propagation et la terminaison (**Halliwell et Gutteridge., 1989**) (figure 07).

**L'initiation:** consiste en la création d'un radical d'acide gras ( $R^\bullet$ ) à partir d'un acide gras (RH) par soustraction d'un atome d'hydrogène provenant d'un groupement méthylène  $-CH_2-$  bis allylique. Cette déshydrogénation peut être provoquée par un initiateur radicalaire tel que le  $OH^\bullet$  et le  $HOO^\bullet$ .



**La propagation:** le radical centre sur le carbone ( $R^\bullet$ ) va subir un réarrangement pour former, par délocalisation de la double liaison, un radical diène conjugué, oxyde en radical peroxyde ( $ROO^\bullet$ ):



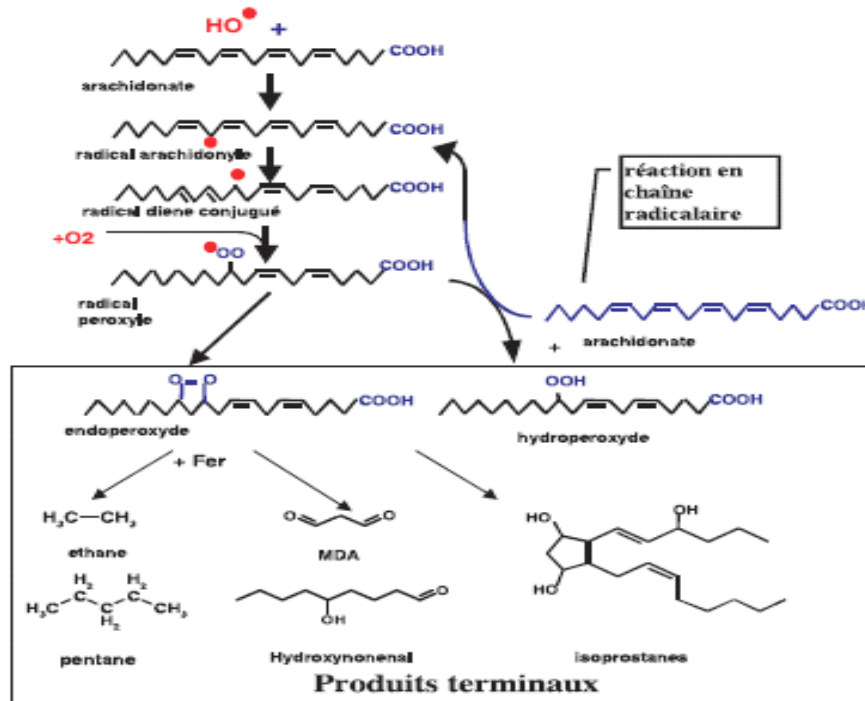
Cette réaction forme rapidement une réaction en chaîne, car le radical peroxyde est suffisamment réactif pour attaquer les autres acides gras polyinsaturés en arrachant un hydrogène et former un hydroperoxyde lipidique (ROOH) ainsi qu'un nouveau radical centre sur le carbone ( $R^\bullet$ ):



Cette étape de propagation peut se reproduire jusqu'à épuisement de l'acide gras et/ou de l'oxygène. Dans ces conditions, une réaction en chaîne s'installe, propagée par les radicaux  $R^\bullet$  et  $ROO^\bullet$ . Ainsi, un tel processus amplifie notablement le phénomène de peroxydation lipidique.

**La phase de terminaison:** L'hydroperoxyde lipidique (ROOH) formé peut être oxydé en présence de métaux de transition divalents de  $Fe_2^+$  ou  $Cu_2^+$  et entraîner la formation d'alcalanes et d'aldéhydes toxiques dont le malonyldialdéhyde (MDA) ou le 4-hydroxynonanal (4-HNE). La réaction en chaîne peut être interrompue (phase de terminaison) par l'association de deux radicaux libres et la formation d'un composé stable ou le plus souvent par la réaction du radical avec une molécule antioxydant (**Armelle., 2004; Josiane et Pierre., 2006; Delattre et al. 2005**).

L'obésité est responsable d'une surproduction des espèces réactives oxygénées (ERO) induite par l'hyperglycémie, qui entraîne une augmentation de la peroxydation lipidique chez l'homme et l'animal. (Louala *et al.*, 2013 ).(figure 07).



**Figure 07** : Mécanisme en chaîne de la peroxydation des acides gras polyinsaturés et nature des produits terminaux formés. (Favier., 2003)

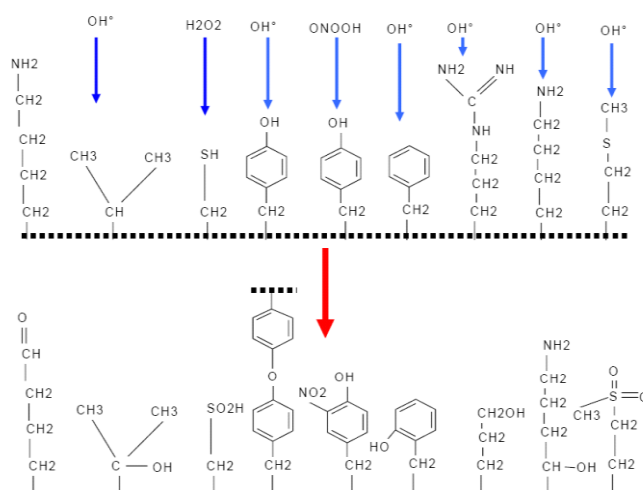
#### 4.2. L'oxydation de l'ADN

Bien que l'ADN soit la mémoire de toute la composition biochimique des êtres vivants (Favier., 2003), Les ERO affectent la qualité de l'ADN, non seulement en induisant, une oxydation des bases de l'ADN, une fragmentation, mais aussi en favorisant la formation d'adduits, qui déforment la structure des bases, Ces dégâts affectent l'ADN nucléaire et mitochondrial. Les composés produits de l'oxydation des bases de l'ADN, la fragmentation de l'ADN et les adduits bloquent la transcription (Ménézo *et al.*, 2012 ) Les DAO inhibent ou modifient l'activité des protéines enzymatiques, telles que la topoisomérase qui n'assure plus la religature des deux brins de l'ADN lors de sa réplication.( Lemkecher *et al.*, 2005 ),La guanine, par exemple, peut réagir avec •OH pour former la 8-hydroxy-2'-déoxyguanosine (8-OH-dG) qui, au lieu de s'apparier avec la cytosine, s'associera avec l'adénine, entraînant des mutations au sein de l'ADN et conduisant à des altérations du message génétique impliquées dans le déclenchement du cancer et le vieillissement.(Haleng *et al.*, 2007).

### 4.3 Oxydation des protéines

Les protéines sont des constituants cellulaires structuraux et fonctionnels, essentiels, qui peuvent subir des modifications oxydatives. L'oxydation des acides aminés, surtout des acides aminés soufrés et acides aminés aromatiques, entraînent des modifications structurales des protéines, (Squier., 2001). Ces modifications s'accumulent avec l'âge dans de nombreux tissus et altèrent la fonction des organes (Davies et Slater., 1987). L'oxydation des acides aminés soufrés entraîne une perte des groupements thiols (Davis *et al.*, 2001) (figure 08).

Les protéines modifiées par oxydation perdent leurs propriétés biologiques et facilitant de ce fait leur agrégation ou leur digestion par les protéases et notamment du protéasome. et deviennent aussi très hydrophobes, soit par suppression de groupements amines ionisables, soit par extériorisation de zones hydrophobes centrales. (Favier., 2003) (figure 08).



**Figure 08:** Nature de quelques modifications des chaînes latérales, d'acides aminés des protéines après attaque radicalaire (Favier., 2003).

La réaction des protéines avec les ERO peut également conduire à la formation de nouveaux radicaux organiques alcoyle ou peroxy (Davies *et al.*, 1995). Ces radicaux peuvent endommager l'ADN. Deux types de dommages sont induits par cette dégradation : des pontages entre les protéines et les bases de l'ADN (Gebicki et Gebicki., 1999; Luxford *et al.*, 2002) mais aussi des dommages oxydatifs (Furukawa *et al.*, 2005)

### 5. Biomarqueurs du stress oxydant

Le stress oxydant peut être évalué par la mesure de plusieurs marqueurs spécifiques. Il s'agit généralement de biomolécules dont la structure chimique a été modifiée par les ERO et ERA.

### 5.1. Marqueurs de l'oxydation des lipides

**a- Malondialdéhyde (MDA):** Le malondialdéhyde (MDA) est un produit de la peroxydation des lipides insaturés. Il peut être formé à partir de composés non lipidiques tels que l'acide ascorbique, les acides aminés, le désoxyribose ou le saccharose, il constitue l'un des indicateurs de la peroxydation lipidique le plus fréquemment utilisé (**Haj Mouhamed *et al.*, 2012**).

**b- Le pentane:** la peroxydation des acides gras polyinsaturés, tels que l'acide linoléique et l'acide linolénique, qui sont tous les deux des composés des membranes cellulaires induit la formation de pentane éliminé par l'air pulmonaire, le pentane est considéré aujourd'hui comme le marqueur le plus spécifique, le plus faible et le plus pertinent de la lipoperoxydation (**Massias *et al.*, 1995**).

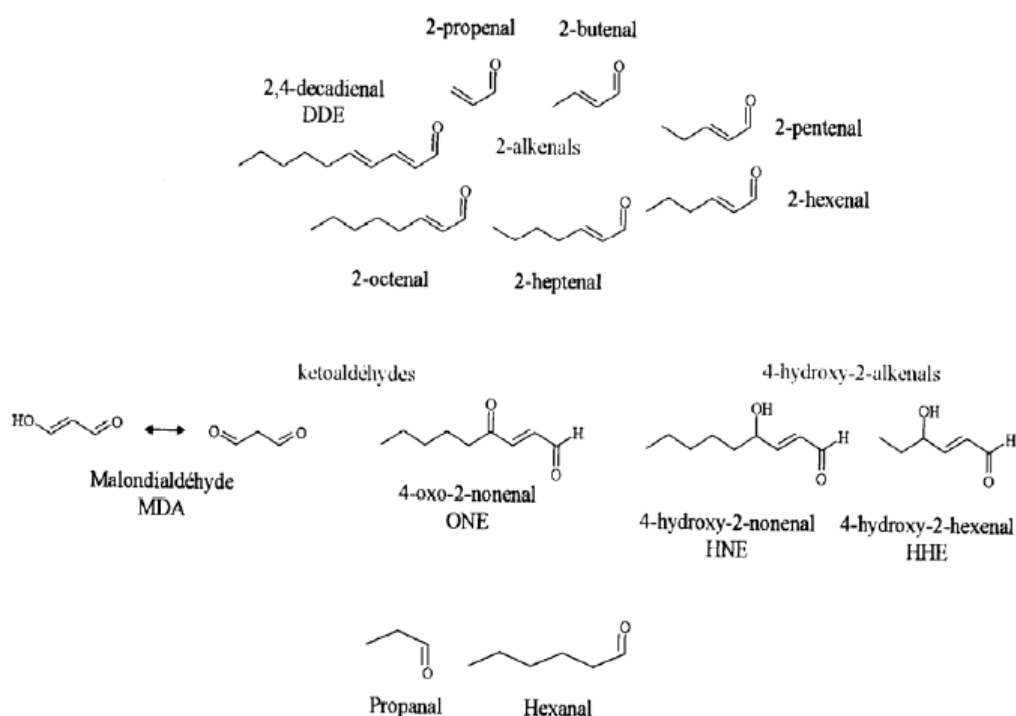
**c- F1-Isoprostanes:** sont produites par l'action de radicaux Libres oxygénés sur l'acide arachidonique estérifié, responsable de sa peroxydation. Circulent dans le plasma forme native ou métabolisée. Du fait de la répartition ubiquitaire de l'acide arachidonique, la synthèse des F,- isoprostanes peut survenir dans toutes les membranes cellulaires, au site de production des radicaux libres (**Cracowski *et al.*, 2000**)

**d- hydroxynonéal (4-HNE):** Le 4-hydroxy-2-nonéal (HNE; figure 09), représente le second aldéhyde formé au cours de la peroxydation lipidique après le malondialdéhyde.

L'adduit majoritaire De l HNE est susceptible d'induire aussi des transversions GC vers TA (**Yves., 2008**).

**e- 4-oxo-nonéal (ONE):** un autre produit de la peroxydation lipidique, est capable de former des adduits avec la guanine (**Lee *et al.* 2005**) l'adénine (**Lee et Blair., 2000; Lee *et al.*, 2000**) et la cytosine (**Pollack *et al.*, 2003**) (figure 09)





**Figure 09:** Produits terminaux de la peroxydation lipidique (Olivier., 2006)

## 5.2. Marqueurs de l'oxydation des protéines

Lorsque les acides aminés constituant une protéine sont oxydés, ils peuvent former un groupement carbonyle que l'on peut rechercher (réaction avec du 2,4 dinitrophenylhydrazine) mais il s'agit d'une méthode peu spécifique. Les carbonyles présentent l'avantage d'être stables ce qui rend leur méthode de dosage plus aisée.

Elles s'accumulent lors de vieillissement cellulaire, de lésions d'ischémie-reperfusion, d'inflammation chronique et de nombreuses autres maladies (diabète, insuffisance rénale...) (Dalle-Donne *et al.*, 2006).

## 5.3. Marqueurs de l'oxydation de l'ADN

Lorsqu'une guanine d'un nucléotide est hydroxylée en 8-hydroxy-2'-deoxyguanine, le nucléotide obtenu est la 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine ou 8OHdG est non fonctionnel et excisé entièrement. La 8OHdG se retrouve dans les urines et le plasma et peut être dosée par des techniques de chromatographie (Powers *et al.*, 2010).

## 6. Systèmes antioxydants

Pour se protéger des effets délétères des ERO, l'organisme dispose d'un ensemble complexe de défenses antioxydantes. On distingue deux sources d'antioxydants: l'une est apportée par l'alimentation sous forme de fruits et légumes et l'autre est endogène et se compose d'enzymes, de protéines (Defraigne et Pincemail., 2007; Haleng *et al.*, 2007).

### 6.1. Système antioxydant enzymatique

Les systèmes enzymatiques extrêmement complexes permettent de protéger les cellules contre les radicaux libres. S'y ajoutent quelques oligo – éléments qui sont les co – facteurs de divers enzymes à activité antioxydante. (Defraigne, Pincemail., 2007).

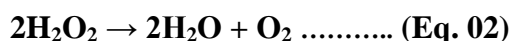
**6.1.1. Superoxyde dismutases (SOD):** sont des métalloenzymes qui catalysent la dismutation des ions superoxydes en peroxyde d'hydrogène et d'oxygène (Eq. 01) (Zelko *et al.*, 2002).



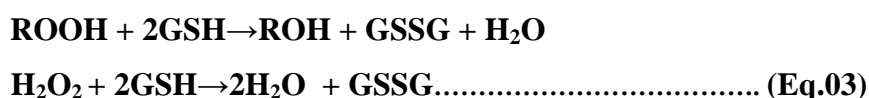
Chez l'homme il existe trois isoenzymes

- Une forme cytosolique associée aux ions cuivre et zinc (Cu/Zn-SOD).
- Une forme mitochondriale associée au manganèse (Mn-SOD).
- Une forme extracellulaire (Ec-SOD) c'est une SOD à cuivre-zinc (Crapo., 1997; Haleng *et al.*, 2007 ).

**6.1.2. Catalase (CAT):** La catalase est une enzyme hémique a cofacteur fer, localisée dans les peroxysomes, en particulier dans les hépatocytes et les érythrocytes capable de transformer le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire (Eq. 02). (Boussekine., 2014)



**6.1.3. La glutathion peroxydase séléno-dépendante (GPx):** Cette enzyme qui se localise dans la mitochondrie et dans le cytosol (Favier., 2003). Décompose les hydroperoxydes organiques et peroxyde d'hydrogène.. L'enzyme possède une grande spécificité pour le glutathion réduit (GSH) qui est utilisé comme donneur d'hydrogène au cours des réactions de décomposition ; il s'en suit la formation du glutathion oxydé (GSSG), La GPx est donc en compétition avec la catalase pour le substrat H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, (Eq.03) (Valko *et al.*, 2007; Valko *et al.*, 2006).



**6.1.4. La glutathion réductase (GR):** La glutathion réductase, quant à elle, a pour rôle de régénérer le GSH à partir du GSSG grâce au NADPH qui est utilisé comme donneur d'électrons. En effet, la concentration cellulaire en glutathion étant limitée, il est nécessaire de le réduire constamment pour que la GPx maintienne sa fonction (**Srinivason *et al.*, 2012**).

**6.1.5. Glutathion S-transférase (GST) :** réduit les hydroperoxydes en alcools (Eq.04)



Les glutathion S-transférases constituent une famille de protéines jouant un rôle clé dans la détoxification de plusieurs composés hydrophobes et électrophiles endogènes. Tous les eucaryotes expriment plusieurs isoenzymes cytosoliques et membranaires, par ailleurs ces enzymes sont subdivisées en six (6) classes selon leurs propriétés structurales, biochimiques et immunologiques ; on distinguera ainsi les classes alpha ( $\alpha$ ), kappa ( $\kappa$ ), mu ( $\mu$ ) pi ( $\pi$ ), sigma ( $\sigma$ ) et thêta ( $\tau$ ) (**Hayes et Pulford., 1995**).

**6.1.6. La thiorédoxine (TRX) :** Elle intervient dans la dégradation des peroxy-des lipidiques et du peroxyde d'hydrogène, ainsi que dans la régénération du radical ascorbyl en acide ascorbique.. Il consomme aussi du NADPH dans son fonctionnement. Il joue un rôle protecteur contre une grande variété de stress oxydatifs (**Haleng *et al.* , 2007**).

**6.1.7. Hèmes oxygénase:** C'est une enzyme inductible et ubiquitaire qui dégrade l'hème en fer ferreux ( $\text{Fe}_2^+$ ), monoxyde de carbone (CO) et biliverdine Cette dernière est ensuite transformée par la biliverdine réductase en bilirubine, puissant anti-oxydant, Il existe trois isoformes d'hème oxygénase : HO-1, HO-2 et HO-3 (**Grochot-Przeczek *et al.*, 2012; Susana *et al.* , 1994; Shinobu *et al.* , 1999**)

**6.1.8. Peroxyredoxines (PRX):** Les peroxyredoxines aussi appelées thiorédoxines peroxydases, sont des peroxydases non hémiques contenant un résidu cystéine au niveau de leur site catalytique. Elles possèdent généralement les mêmes capacités peroxydasiques que les POX, mais avec une efficacité moindre (**Navrot *et al.*, 2006**). La réduction du substrat s'effectue par oxydation du groupement thiol (-SH) de la cystéine en acide sulfénique (-SOH). La réduction de l'acide sulfénique est due à l'oxydation de co-substrats tels que les thiorédoxines, glutaredoxines et cyclophilines (**Dietz *et al.*, 2006; Dietz., 2007**).

**6.1.9. La NAD(P) H quinone oxydoréductase 1 :** La NAD(P) H quinone oxydoréductase 1 (NQO1) est une flavoenzyme qui est principalement localisée dans le cytosol. Elle réduit les deux électrons célibataires des quinones en utilisant le NADPH ou le NADH comme cofacteur. Elle empêche la formation de produits réactifs (semiquinones) qui

entraînent la formation d'ERO et assure le maintien de la vitamine E sous forme réduite et donc active (Clémentine., 2013).

**6.1.10. Les paraoxonases (PON) :** Les paraoxonases sont des enzymes estérases  $\text{Ca}^{2+}$ -dépendantes, contribuent à la défense antioxydante vasculaire. Il existe trois isoformes de PON dont deux sériques, synthétisées dans le foie et circulant en association avec les HDL: la paraoxonase/arylesterase-1 ou PON1 et la paraoxonase/lactonase-3 ou PON3. La paraoxonase/arylesterase-2 ou PON2 est exprimée dans de nombreux types cellulaires. Les PON sériques, en particulier PON1, posséderaient une activité similaire à la peroxydase, et l'isoforme PON2 pourrait réduire les niveaux d'ERO dans les cellules endothéliales humaines. (Aviram *et al.*., 1998; Benjamin., 2015)

### 6.2. Les systèmes antioxydants non enzymatiques

L'organisme se protège par un ensemble de systèmes antioxydants. Certains composés antioxydants comme l'ubiquinone ou les caroténoïdes, les vitamines E, C apportés par les aliments agissent en piégeant les radicaux. Des composés endogènes jouent le même rôle, comme le glutathion réduit et Ubiquinol et cytochrome c, les métallothionéines.

#### 6.2.1. Molécules anti-oxydantes endogènes

**a- Le glutathion:** Le glutathion est un tripeptide (acide glutamique-cystéine-glycine). Il est le thiol (-SH) majoritaire au niveau intracellulaire où il est présent sous forme essentiellement réduite (GSH) (Haleng *et al.*, 2007), Il réagit dans le cadre de réactions enzymatiques catalysées par les glutathion peroxydases (activités dites selenodépendantes). En ce qui concerne le peroxyde d'hydrogène, le glutathion peut en plus réduire le peroxyde, assiste par les glutathion transférases (activité glutathion peroxydase dite non selenodépendante). (Descamps *et al.*, 2006).

**b- Ubiquinol et cytochrome c:** Il a été décrit précédemment que les ubiquinones, sous leur forme semi-radicalaire, jouaient un rôle fondamental dans la production de ROS. Inversement, il a pu être défini que la forme "ubiquinol" agissait comme antioxydant. (Blandine., 2006). L'ubiquinol protège les membranes de la peroxydation lipidique par une diminution de la formation et de la propagation de radicaux peroxy. (Packer *et al.*, 1997). Le cytochrome c présent dans l'espace intermembranaire a un rôle de détoxification en captant l'électron libre d' $\text{O}_2^{\cdot-}$  produit au niveau de la chaîne respiratoire. Ainsi réduit, il cède cet électron au complexe IV formant du cytochrome c oxydé et de l' $\text{H}_2\text{O}$  (Skulachev., 1998).

**c- Les métallothionéines :** Cette protéine de faible poids moléculaire (6 kDa possédant 57-58 acides aminés chez les crustacés) très riche en cystéine (18 des acides aminés), De plus, sa structure lui confère des capacités dans la protection contre les radicaux libres et les

dommages oxydatifs (**Pedersen *et al.*, 1996**) en piégeant les ions superoxydes et les radicaux hydroxyles (**Thornalley et Vasak., 1985**)

**d-Acide urique:** L'acide urique est le produit terminal du catabolisme des bases puriques chez l'homme. L'acide urique est doté de puissantes propriétés antioxydantes et est formé par la xanthine deshydrogénase. Il neutralise en fait 10 à 15% du radical hydroxyle produit quotidiennement, et peut aussi neutraliser les radicaux peroxydes, de même que l'oxygène singlet (**E. Descamps *et al.*., 2006; Yuliya *et al.*., 2015**).

**e-Bilirubine:** La bilirubine est un produit terminal de la dégradation de l'hème, La bilirubine est capable de piéger  $ROO^\bullet$  l'oxygène singlet. Ainsi, elle protège l'albumine et les acides gras liés à l'albumine des attaques radicalaires (**Haleng *et al.*, 2007; Libor., 2012**).

**f-Mélatonine:** La mélatonine est une neurohormone synthétisée et sécrétée par l'épiphyse, La mélatonine est dotée d'un large spectre antioxydant, pouvant neutraliser des espèces incluant l'anion superoxyde, les hydroperoxydes, le radical hydroxyle, le NO et le peroxy-nitrite. (**Descamps *et al.*., 2006**).

**g- Glucose et mannitol:** Inactivent le radical hydroxyle  $HO^\bullet$  et pourraient ainsi jouer un rôle protecteur de la glycation des protéines. Cette réactivité mérite d'être soulignée dans le cadre de l'exercice physique et de l'évolution des potentialités antioxydantes du sang. (**Dubois., 2015**).

### 6.2.2. Molécules anti-oxydantes exogènes

**a-Vitamine E et Vitamine C:** Sous le terme vitamine E est regroupée la famille des tocophérols ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$ ). Le caractère hydrophobe de la vitamine E lui permet de s'insérer au sein des acides gras de la membrane cellulaire et des lipoprotéines, où elle joue un rôle protecteur en empêchant la propagation de la peroxydation lipidique induite par un stress oxydant. Seuls  $\alpha$  et  $\delta$  tocophérols possèdent les propriétés antioxydantes les plus intéressantes (**Vertuani *et al.*, 2004**).

La vitamine C peut directement réagir avec des espèces réactives de l'oxygène comme ( $HO^\bullet$ ) ou ( $O_2^\bullet$ ). Elle peut recycler l' $\alpha$ -tocophérol pour aider à prévenir l'oxydation des lipides (**Vertuani *et al.*, 2004**).

**b-  $\beta$ -carotène:** Le  $\beta$ -carotène est apporté par l'alimentation. Il est doué de plusieurs capacités: il est précurseur de la vitamine A, il capte l'oxygène singlet sous faible pression d'oxygène et, avec les autres caroténoïdes, il a le pouvoir de terminer les réactions en chaîne de lipoperoxydation. Il protège les structures cellulaires contre l'agression oxydante (**Goudable et Favier., 1997**).

**c-Oligoéléments:** Les oligoéléments apparaissent à des taux faibles dans notre organisme et certains d'entre eux, intervenant dans de multiples processus physiologiques, (Rich., 1996). Toutes les enzymes antioxydantes requièrent un cofacteur pour maintenir leur activité catalytique. Ainsi, la SOD mitochondriale a besoin de manganèse, la SOD cytosolique de cuivre et de zinc, la catalase de fer et la GPx de sélénium.

**d-Polyphénols:** Les flavonoïdes regroupent une grande variété de composés comprenant entre autres les flavonoïdes, les anthocyanes et les tanins. Les flavonoïdes alimentaires ont des propriétés antioxydantes importantes et variées. Notamment, ils peuvent neutraliser divers radicaux libres, chélater les métaux et inhiber la peroxydation lipidique. (Descamps *et al.*; 2006)

### III. *Thymus numidicus*

L'utilisation des molécules antioxydantes de synthèse est actuellement remise en cause en raison des risques toxicologiques potentiels. Désormais, de nouvelles sources végétales d'antioxydants naturels sont recherchées, dont les polyphénols qui sont des composés naturels largement répandus dans le règne végétal, qui ont une importance croissante grâce à leur rôle d'antioxydants naturels ( Djeddi *et al.* ,2015).

#### 1. Présentation de la famille des *Lamiacées*

La famille des *lamiacées* est l'une des familles les plus utilisées comme source mondiale d'épices et d'extrait à fort pouvoir antimicrobien, antifongique, anti-inflammatoire et antioxydant . (Gherman *et al.*, 2000; Djeddi *et al.* , 2015).

Cette famille comprend près de 6700 espèces regroupées dans environ 250 genres. (Miller *et al.*, 2006)

Un très grand nombre de genres de la famille des *Lamiacées* sont des sources riches en terpénoïdes, flavonoïdes, iridoïdes glycosylés et composés phénoliques. (Naghbi *et al.*, 2005).

#### 2. Le genre *Thymus*

Ce genre comprend près de 300 à 400 espèces. Les premiers travaux sur le thym datent de 1924 où Ronniger<sup>1</sup> a étudié des populations britanniques de *Thymus* qu'il a divisées en un très grand nombre de micro-espèces. (Kabouche., 2005).

##### 2.1. Origine du nom

Le mot «thym» provient du terme grec «Thymos» qui signifie «fumée», D'autres, enfin, ont dérivé le mot du grec *Thumus*, qui signifie «courage». (<http://www.passeportsante.net>).

### 2.2. Historique de l'utilisation du thym en phytothérapie

Présente sur l'ensemble du bassin méditerranéen, la plante est utilisée depuis la très haute Antiquité, déjà à Sumer il y a 5 000 ans ou en Egypte afin d'embaumer les morts. Il est employé en Grèce ancienne afin de purifier l'air. De par ses origines mythologiques, il y symbolise aussi le courage. C'est surtout à partir du Moyen Age que ses vertus médicinales commencent à être reconnues, notamment pour lutter contre les épidémies, principalement de lèpre ou de peste. A partir du XVIe siècle, il est signalé dans les traités de médecine pour traiter une large variété d'affections. Il faudra attendre le XIXe siècle toutefois pour que ses composants actifs soient répertoriés, le thym servant au siècle précédent surtout à des fins aromatiques. (<http://www.doctissimo.fr>).

### 2.3. Distribution géographique

**Dans le monde:** il existe près de 350 espèces de thym réparties entre l'Europe, l'Asie de l'ouest et la méditerranée. C'est un genre très répandu dans le nord ouest africain (Maroc, Algérie, Tunisie et Libye), il pousse également sur les montagnes d'Ethiopie et d'Arabie du sud ouest en passant par la péninsule du Sinaï en Egypte (**Mebarki., 2010**).

**En Algérie:** Le thym, communément appelé 'Zaatar' en Algérie (**Kabouche. et al., 2005; Miura et al., 2002**) est caractérisé par une grande extension: il pousse dans les montagnes et sur le littoral (**Hilan et al., 2010** ).

Le thym comprend plusieurs espèces botaniques réparties sur tout le littoral et même dans les régions internes jusqu'aux zones arides sa répartition géographique en Algérie, est représentée dans le Tableau 01 (**Mebarki., 2010**).



**Figure 10:** *Tymus numidicus* Poiret (**Kabouche., 2005** ).



Tableau 01: Répartition géographique en Algérie (Mebarki., 2010).

Espèces	Découverte par	Localisation	Nom local
<i>Thymus capitatus</i>	Hoffman et Link	Rare dans la région de Tlemcen.	Zaâteur
<i>Thymus fontanesii</i>	Boiss et Reuter	Commun dans le Tell, Endémique Est Algérie-Tunisie.	Zaâteur
<i>Thymus commutatus</i>	Battandier	Endémique Oran.	-
<i>Thymus numidicus</i>	Poiret	Assez rare dans le sous secteur de l'atlas tellien ; la grande et la petite Kabylie ; de Skikda à la frontière tunisienne et tell constantinois.	Tizaâtar
<i>Thymus guyonii</i>	Noé	Rare dans le sous secteur des hauts plateaux algérois, oranais et constantinois.	-
<i>Thymus lancéolatus</i>	Desfontaine	Rare dans le secteur de l'atlas tellien (Terni de Médéa BENCHICAO) et dans le sous secteur des hauts plateaux algérois, oranais (Tiaret) et constantinois.	Zaâteur
<i>Thymus pallidus</i>	Coss	Très rare dans le sous secteur de l'atlas saharien et constantinois.	Tizerdite
<i>Thymus hirtus</i>	Willd	Commun sauf sur le littoral.	Djertil hamrya
<i>Thymus glandulosus</i>	Lag	Très rare dans le sous secteur des hauts plateaux algérois.	-
<i>Thymus algériensis</i>	Boiss et Reuter	Très commun dans le sous secteur des hauts plateaux algérois et oranais	Djertil Zaitra
<i>Thymus munbyanus</i>	Boiss et Reuter	Endémique dans le secteur nord algérois	Djertil

#### 2.4. Classification de chimiotypes des thymus

La classification et la reconnaissance des thymus sont très complexes. Cent variétés sont actuellement connues, ils s'hybrident assez facilement et certaines espèces ne se différencient que par la variation de l'HE ou par la couleur des fleurs, la forme des feuilles et l'odeur,



englobe sept grandes variétés (chémotypes) de Thyms: Thymol, Linalol, Thujanol, Carvacrol, Géraniol, Alpha terpinéol et Paracymène.

- **Chimiotype thymol:** on le retrouve dans tous les types de sols où le thym peut évoluer, des sols extrêmement chauds et secs aux sols plus humides, particulièrement remarquable dans toutes les maladies infectieuses, les troubles broncho-pulmonaires, les diarrhées infectieuses et les grosses fatigues, c'est également un puissant désinfectant aérien.
- **Chimiotype Linalol :** réputé chasser les parasites intestinaux, les infections génitales, les vaginites et les mycoses, c'est un tonique utérin.
- **Chimiotype Thujanol :** une autre variété médicinale majeure, en particulier pour tout ce qui concerne les problèmes immunitaires (antivirales, antibactériens, antifongiques...) mais aussi et surtout pour les problèmes hépatiques, liés donc au foie et à la vésicule biliaire.
- **Chimiotype géraniol:** est, quand-à lui, moins efficace pour l'immunité, mais plus adapté aux jeunes enfants et pour les problèmes de peau.
- **Chimiotype paracymène:** plus connu pour son action sur les douleurs ostéopathiques, l'arthrose, les rhumatismes, les névralgies diverses comme les névralgies dentaires.
- **Chimiotype saturéoïde (à bornéol):** est particulièrement puissant pour les troubles immunitaires, c'est un antibactérien à très large spectre, d'ailleurs en aromathérapie le thym Saturéoïde est considéré comme une huile essentielle majeure et comme un puissant tonique général, ayant une action aphrodisiaque lié à sa tonicité, et très efficace pour tout ce qui concerne les troubles respiratoires.
- **Chimiotype Serpolet** (qui n'est pas du *Thymus vulgaris*): parmi les autres variétés de thym, il existe le Serpolet (*Thymus serpyllum*), particulièrement efficace pour les maux de gorge, la toux et comme neurotonique (**Hilan *et al.*, 2010; Ginseng, 2013**).

Les types  $\gamma$ - terpinène et  $\rho$ - cymène sont deux précurseurs de la biosynthèse végétale du thymol et du carvacrol. Les groupements thymol et carvacrol sont installés sur des sols rouges, argileux, plus ou moins caillouteux, peu profonds et sont physiologiquement les plus secs de la région (**Hilan *et al.*, 2010** ).

### 2.5. Principes actifs du *Thym*

**Les acides phénoliques:** acide caféique, acide rosmarinique ( **Zeghad., 2009**).

**Les flavonoïdes:** hespéridine, eriotricine, narirutine ( **Zeghad., 2009** ), Lutéoline ( **Bazylko et Strzelecka., 2007**).

**Les polyphénols:** tannin ( **Zeghad., 2009**).

### 2.6. Propriétés thérapeutiques de cette plante

- Le thym utilisé principalement dans le domaine médical pour ses propriétés antiseptique, antispasmodique et antitussive ( **Ben El Hadj et al., 2014** ).
- Le thym est la plante médicinale la plus utilisée en médecine traditionnelle algérienne comme expectorant, stomachique, carminatif et diurétique. Il est aussi utilisé comme condiment, En usage cosmétique (parfums, soins de beauté) ( **Kabouche., 2005** ).
- Indiqué en cas d'infections respiratoires telles que la bronchite, la grippe, la toux et les maux de gorge. Ainsi, il est possible de l'employer dans un diffuseur de parfum pour désinfecter la chambre d'un malade ( **Ginseng., 2013** ).
- L'huile essentielle de thym possède une activité antifongique ( **Ruberto et al., 1993** ) et caractérisée par un fort potentiel antimicrobien ( **Cosentino et al., 1999** ).
- Effet antioxydant ( **Economou et al., 1991** ), liés principalement à la présence de composés phénoliques en grandes proportions dans cette huile essentielle. Le thymol, le carvacrol et le p-cymène-2, 3-diol isolé à partir de l'huile essentielle du thym confirment également cette activité antioxydante ( **Ternes et al., 1995** ).

### 3. *Thymus numidicus*

*Thymus numidicus* Poiret. (Lamiaceae) est une plante largement utilisée en médecine traditionnelle algérienne pour ses propriétés thérapeutiques ( **Djeddi et al., 2015** ).

#### Noms vernaculaires:

- **En Français:**
  - Thym ( **Mebarki., 2010** ).
- **En Arabe:**
  - Tizaâtarte ( **Mebarki., 2010** ).
  - Zaâtar ( **Kabouche et al., 2005** ).

#### Nom scientifique:

*Thymus numidicus* ( **Mebarki., 2010** ).

### 3.1. Place dans la systématique

Tableau 02: Place dans la systématique

Règne	Plante
Division	Spermaphytes
Subdivision	Angiospermes
Classe	Dicotylédone
Ordre	Lamiales
Famille	Lamiacées
Genre	<i>Thymus</i>
Espèce	<i>numidicus</i> Poiret

### 3.2. Description botanique

C'est un très petit arbuste, haut, de cinq à six pousses au plus, dont les racines font grêles, ses branches font chargées presque dès leurs base de rameaux nombreux, épars, presque'opposés, étalés, un peu anguleux, droit, légèrement pubescents à leur partie supérieure, garnis de feuilles opposées, presque sessiles, plus longues que les entre-nœuds très ouvertes, étroites, linéaires, très entières, glabres à leurs deux faces, rétrécis à leur base, aigues à leurs sommet, longues de quatre à cinq lignes, larges d'un peu plus d'une demi-ligne.

Les fleurs font réunies à l'extrémité des rameaux en épis courts, capité, garnis de bractées ovales, lancéolées, aigues, élargies à leur base, ciliées, ponctuées, le calice très velu coloré, à cinq dents sétacées, fortement ciliées de longs poils blanchâtres, la corolle petite, de couleur rose ou un peu purpurine, les étamines plus longues que la corolle, les anthères un peu globuleuses, à deux loges, le style presque de la même longueur que les étamines, deux stigmates aigus ( **Benayache., 2013**).

**Assez rare** : dans le sous secteur de l'atlas tellien, la grande et la petite Kabylie de Skikda à la frontière tunisienne, Tell constantinois. Il existe en Algérie et en Tunisie (**Mebarki., 2010**).

### 3.3. Composition de l'huile essentielle du *Tymus numidicus*

40 composants, représentant 99.7% de l'huile essentielle du *Tymus numidicus*, ont été identifiés. Cette huile est majoritairement composée de thymol (68.2 %), carvacrol (16.9%) et de linalol (11.5%).

L'huile essentielle du *T. numidicus*, présente les plus hauts pourcentages en thymol+carvacrol (68.2+16.9%), jamais observés, dans une huile essentielle d'espèce *Thymus* (**Kabouche et al., 2005**)

### 3.4. Propriétés thérapeutiques de cette plante

- L'huile essentielle de *Thymus numidicus* possède une activité antibactérienne (**Zeghib et al., 2013**).
- Les extraits méthanolique et méthanol-eau ont une très grande activité de piégeage des radicaux libres du DPPH et du peroxyde d'hydrogène (**DJEDDI et al., 2015**).
- Utilisé principalement dans le domaine médical pour ses propriétés antitussive, anthelminthique, antifongique, anti-inflammatoire et diurétique, carminatif, analgésique, Antispasmodique et antibroncholitique (**Benkiniouar et al., 2010**).
- Insecticide (**Kabouche et al., 2005**).

# **Partie expérimentales**

### I. Matériels

Le but de notre étude est d'étudier et d'évaluer l'effet de *Thymus numidicus* sur la toxicité rénale induite par l'alloxane.

#### a. Animaux

Notre travail est réalisé sur 42 souris males de l'espèce *Mus musculus*, provenant de l'institut Pasteur-Alger, et pèses entre 27g et 36g. Ces animaux mammifères sont de l'ordre de rongeurs.

#### b. Protocole

##### 1. Conditions d'élevage

Les animaux sont élevés dans des cages en polyéthylène spéciales tapissées de litière constituée de copeaux de bois renouvelés chaque jour. Quant à l'eau, il est présenté dans des biberons pendant notre période d'expérience, les animaux ont été accoutumés pendant un mois dans des conditions d'expérimentation.



**Figure 11.** Conditions d'élevage des Souris

##### 2. Traitement des souris

Les souris, au nombre de 42, ont été réparties en 6 lots à raison de sept (07) souris par lot, il s'agit :

**Lot 1:** 07 souris témoins ont reçu l'eau physiologique par injection intrapéritonéale par jour pendant 21 jours.

**Lot 2:** 07 souris traités par injection intra péritonéal (dose unique) de *Thymus numidicus* (50mg/kg).

**Lot 3:** 07 souris traités par injection intra péritonéal (dose unique) d'alloxane à raison de 150 mg/kg.

**Lot 4:** 07 souris alloxaniques (150mg/kg dose unique) traités par injection intra péritonéal de *Thymus numidicus* (30 mg/kg/j) pendant 21 jours.

**Lot 5:** 07 souris alloxaniques (150 mg/kg) traités par injection intra péritonéal de *Thymus numidicus* (50 mg/kg/j) pendant 21 jours.

**Lot 6 :** 07 souris alloxaniques (150mg/kg traités par injection intra péritonéal de *Thymus numidicus* (100 mg/kg/j pendant 21 jours).

### 3. Sacrifices des souris et récupération du sang et des reins

Après 21<sup>ème</sup> jours les souris des 6 groupes ont été sacrifiées (figure 12) avec récupération du sang dans des tubes secs, centrifugés à 3000 tours/min pendant 10 minutes, les échantillons obtenus ont été stockés au congélateur à  $-20^{\circ}\text{C}$  jusqu'à l'analyse (dosage de la créatinine, l'urée et les protides totaux).



**Figure 12.** Le sacrifice de souris

- Les souris sacrifiées ont été pesées puis disséquées pour le prélèvement des reins (figure 13)



**Figure 13.** Prélèvement des reins.

Après la dissection les reins sont prélevés rincés dans une solution de chlorure de sodium (NaCl) à 0.9%, puis pesées, les reins ont été stockés au congélateur (-80°C) pour le dosage des paramètres du stress oxydant (GST, GSH, GPx CAT, MDA).



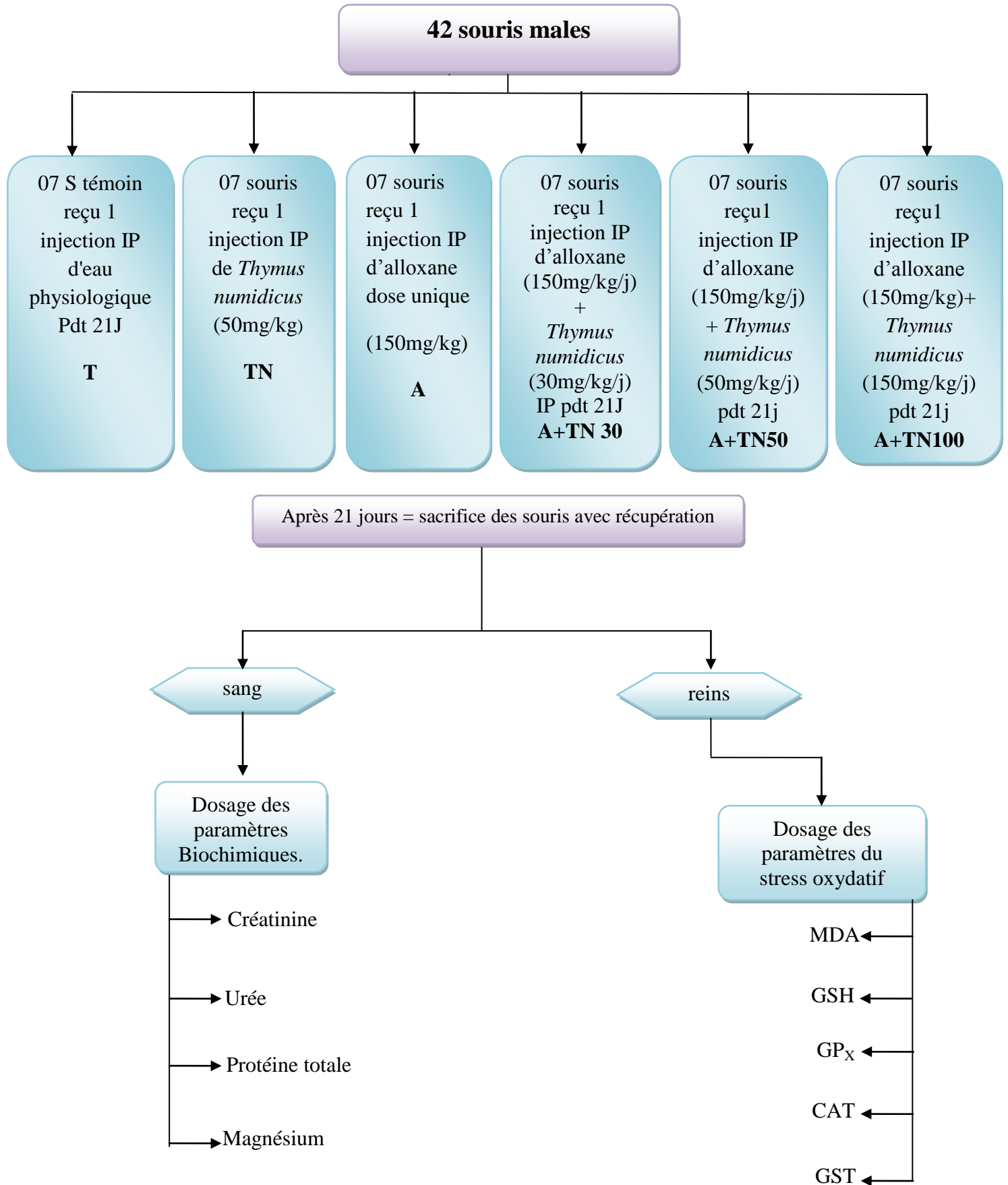


Figure 14: Schéma récapitulatif du protocole expérimental

### C. Paramètres analysés et méthodes

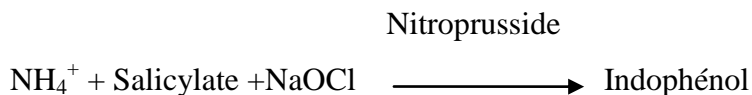
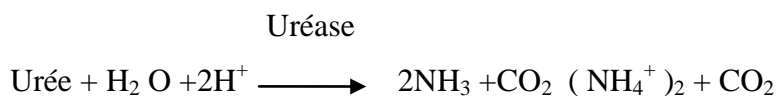
#### 1. Paramètres métaboliques

##### 1.1. Dosage d'urée sanguine

###### Principe

Le dosage de l'urée a été réalisé par la méthode enzymatique colorimétrique à l'uréase selon la fiche technique (Spinréact).

L'urée est hydrolysée enzymatiquement à l'ammoniaque ( $\text{NH}_4^+$ ) et le dioxyde de carbone ( $\text{CO}_2$ ). Les ions ammoniacaux ainsi formés réagissent avec du salicylate et l'hypochlorite ( $\text{NaClO}$ ), en présence d'un catalyseur nitroprusside, pour former un indophénol vert, selon les réactions ci-dessous :



L'intensité de la couleur est proportionnelle à la concentration d'urée dans l'échantillon (Kaplan., 1984).

###### ❖ Protocole expérimentale

- Ajouter 10 $\mu\text{l}$  d'échantillon à 1ml de réactif 1 [ urease 30000 U/L dissoute dans un tampon phosphate pH6.7: 50mmol/l contenant (EDTA: 2mmol/l, salicylate de sodium : 400mmol/l, nitroprusside de sodium : 10mmol/l)].
- Agiter et incuber à 37°C pendant 5 minutes.
- Ajouter 1ml de réactif 2 (hypochlorite de sodium: 140mmol/l, hydroxyde de sodium : 150 mmol/l) au mélange.

###### ❖ Lecture

- Mesurer l'absorbance contre un blanc réactif à 580nm avec utilisation d'un étalon.

**1.2. Dosage de la créatinine** : selon la fiche technique Spinréact .

**Principe**

La créatinine présente dans l'échantillon réagit avec l'acide picrique en milieu alcalin pour donner un complexe coloré, mesuré dans un intervalle de temps défini (**Murray *et al.*, 1984**).

❖ **Protocol expérimental**

- Ajouter 100µl d'échantillon (sérum) a 1ml de réactif de travail [V/V : R1 : 17.5 mmol/l d'acide picrique + R2 :0.29 mmol/l d'hydroxyde de sodium].
- Mélanger

❖ **Lecture**

Lire l'absorbance (A1) après 30 secondes et après 90 secondes (A2) pour l'échantillon à une longueur d'onde 492nm.

❖ **Calcul**

$$\Delta A = A2 - A1$$

$$[créatinine](mg/dl) = \frac{\Delta A \text{ échantillon}}{\Delta A \text{ Etalon}} \times 2(\text{concentration de l'étalon})$$

**1.3. Dosage des protéines Totales**

**Méthode de biuret**

❖ **Principe**

Les protéines sériques forment un complexe bleu violet avec les sels de cuivre en milieu alcalin (réaction de type biuret).

**Procéure** : pipeter dans de tubes a essai:

**Tableau 3:** Mode opératoire

	Blanc	Etalon	Echantillon
Echantillon (µL)	-	-	20µl
Etalon (µL)	-	20µl	-
blanc	20µl	-	-
Réactif de biuret	1ml	1ml	1ml

- Mélanger, incuber 5 mn à température ambiante
- Lire la DO a 546nm contre le blanc
- La coloration est stable 30mn.

### ❖ Calcul

$$\text{protéine totale} = \frac{DO_{ech}}{DO_{et}} \times 60$$

60= valeur du standard étalon

### 1.4 Magnésium

Les mesures sont réalisées sur le sérum par une méthode colorimétrique selon la fiche technique Spinreact .Ce dosage est basé sur la réaction du magnésium avec le Magon sulfonate en milieu alcalin formant un complexe coloré (**Farrell et Kaplan, 1984**).

Dans un tube sec 10µl d'échantillon (sérum) sont additionnées à 1ml de réactif de travail (bleu de xylidyl : 0.1 mmol/l, acide thioglycolique : 0.7 mmol/l, DMSO : 3mol/l), agitation, incubation 05minutes à température ambiante à 3minutes à 37°C. Lecture de la densité optique à  $\lambda = 546$  nm contre un blanc réactif avec utilisation d'un étalon.

$$[Mg^{++}](mg/dl) = \frac{DO_{Ech}}{DO_{Eta}} \times 2(\text{concentration de l'étalon})$$

## 2. Paramètres enzymatiques

### 2.1. Préparation de l'homogénat pour le dosage des paramètres du stress oxydatif

Un gramme des reins des différentes souris étudiées, a été utilisé. Après le broyage et homogénéisation des tissus dans TBS (Tris 50 mM, NaCl 150m M, pH 7.4), le mélange mise dans des glaçons on a procédé à une centrifugation de la suspension cellulaire (9000 trous/min, 4°C, 15 min), puis le surnageant obtenu est aliquoté dans des tubes eppendorfs puis conservés à -80°C en attendant d'effectuer les dosages des paramètres du stress oxydatif.

### 2.2. Dosage du glutathion

#### ❖ Principe

Le taux du glutathion est quantifié selon la méthode de (**Weekbeker et Cory., 1988**).

Dont le Principe repose sur la mesure colorimétrique 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. Une fois préparé, l'homogénat doit subir une déprotéinisation par (l'acide sulfosalicylique 0.25%) afin de protéger les groupements-SH du glutathion.

### ❖ Protocole expérimentale

Une fois préparé, l'homogénat est déprotéinisé: 0.8 ml de ce dernier auquel on ajoute 0.2ml d'une solution d'acide sulfosalicylique (SSA) à 0.25%.

- Agiter le mélange et laisser pendant 15 min dans un bain de glace.
- Centrifugé pendant 5min à 1000 t/min.
- Prélever 0.5 ml du surnageant.
- Ajouter 1 ml de tampon tris-HCL+EDTA (0.02M), pH=9.6.
- Mélanger et ajouter 0.025 ml de (DTNB) à 0.01M dissous dans le méthanol absolu.
- Laisser pendant 5min à température ambiante.

### ❖ Lecture

Lecture de la DO à = 412 nm.

### ❖ Calcul

La concentration en GSH est obtenue par la formule suivante :

$$[GSH] = \frac{D_0 \times 1 \times 1,525}{13100 \times 0,8 \times 0,5mgP_r t} nMGSH/mgP_r t$$

- **D<sub>0</sub>** : Densité<sup>1</sup> optique.
- **1** : Volume total des solutions utilisées de la déprotéinisation. (0.8 ml homogénat +0.2ml SSA).
- **1.525** : Volume total des solutions utilisées dans le dosage du GSH au niveau du surnageant (0.5 ml surnageant+1 ml Tris-EDTA+0.025 ml DTNB).
- **13100** : Coefficient d'absorbance (contenant le groupement-SH à 412 nm).
- **0.8** : Volume de l'homogénat après déprotéinisation trouvé dans 1 ml.
- **0.5** : Volume du surnageant trouvé dans un 1.525 ml.

On que la concentration de GSH est mesuré par apport à 1 mg de protéine. C'est pour cela ce dosage doit être accompagné par le dosage des protéines.

### 2.3. Dosage de l'activité enzymatique de la glutathion peroxydase (GPx)

#### ❖ Principe

L'activité enzymatique de la GPx a été mesurée par la méthode de **Flohe et Gunzler (1984)**. en utilisation l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> comme substrat.

### ❖ Protocole expérimentale

- 0.2 ml de surnageant +0.4 ml de GSH (glutathion forme réduite) a 0.1 MM (réaction enzymatique) +0.2 ml TP a 0.067M (tampon d'extraction pH7.8).
- Préparer un blanc avec 0.4 ml de GSH +0.2 de TP (réaction non enzymatique), Incubation au bain marie à 25°C pendant 05 min.
- 0.2 ml d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1.3MM) pour initier la réaction.
- Laisser agir 10 min.
- Arrêter la réaction par addition de 1 ml de TCA 1%(acide tri chloro-acétique).
- Mettre le mélange dans la glace pendant 30 min.
- Centrifuger durant 10 min a 3000t/mi n.
- 0.48 ml de surnageant et place dans une cuve+2.2 ml de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0.32M) +0.32 ml de DNTB (1MM).
- Formation d'un composé colore,

### ❖ Lecture

Mesurer la densité optique à 412 nm dans le 05 min.

### ❖ Calcul

La détermination (calcule) de l'activité de la GPx se fait de la façon suivant:

- Activité de GSH consommée/min/gr de protéine.
- Blanc=0.04 micro mole de GSH réduit → DO<sub>b</sub>
- Extrait=0.04 // // → DO<sub>e</sub>

Donc la concentration de GSH réduit qui sera oxydée (disparue)= DO<sub>e</sub>-DO<sub>b</sub>

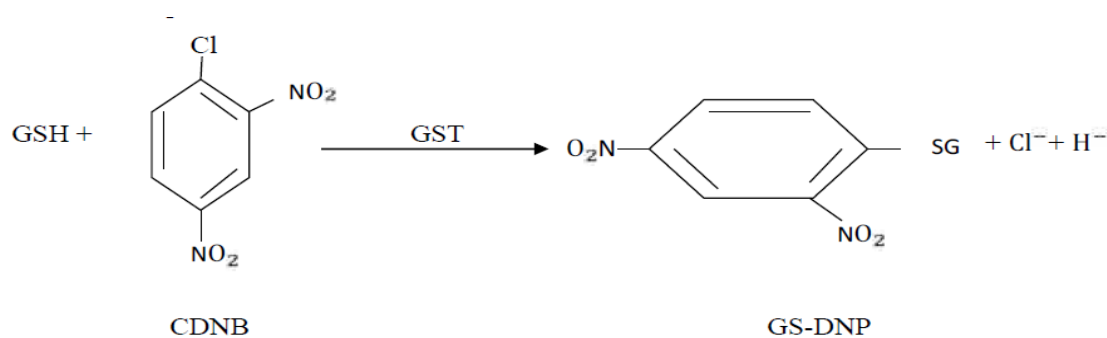
$$X = \frac{(DO_e - DOP) \times 0,04}{DO_b} = \text{quantité de GSH réduite disparue (oxydée)}$$

$$L'activité de la GPx = X \times \frac{5}{\text{La concentration de protéine}}$$

## 2.4. Dosage de l'activité enzymatique de la glutathion S-Transférase(GST)

### ❖ Principe

La mesure de l'activité de glutathion S-Transférase (GST) est déterminée selon la méthode de **Habig et al (1974)**, Elle est basée sur la réaction de conjugaison entre la GST et un substrat, le CDNB (1-Chloro2, 4 di nitrobenzène) en d'un cofacteur le glutathion (GST), la conjugaison entraine la formation d'une molécule nouvelle ; 1-S-Glutathionyle 2-4 Di nitrobenzène permettant de mesurer l'activité de GST selon la réaction suivante :



La valeur de la densité optique mesurée est directement proportionnelle à la quantité de conjugué formé elle-même liée à l'intensité de l'activité GST .

#### ❖ Protocol

Le dosage consiste à faire réagir 200µl du surnageant avec 1.2ml du mélange CDNB (1mM), GSH (5mM) [20.26mg CDNB, 153.65mg GSH, 1ml éthanol, 100ml tampon phosphate (0.1M, Ph 6)].

#### ❖ Lecture

La lecture des absorbances est effectuée pendant une minute et chaque 15 secondes à une longueur d'onde de 340nm contre un blanc contenant 200µl d'eau distillée remplaçant la quantité de surnageant.

#### ❖ Calcul

$$GST \text{ (nmol GST /min/mgprotéine)} = \frac{DO(\text{min}) \times V_A}{e \times V_s} / \text{mgde protéine}$$

**DO :** Densité optique de l'échantillon /min.

**DO/min blanc :** Densité optique du blanc /min

**e:** Coefficient d'extinction molaire du CDNB = 9,6mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>

**V<sub>A</sub>:** Volume totale dans la cuve (0,2ml.Surnageant + 1,2mélange).

**V<sub>s</sub>:** Volume du surnageant dans la cuve (0,2ml).

### 2.5. Dosage des protéines tissulaire

#### ❖ Principe

Les protéines réagissent avec un réactif coloré contenant de l'acide ortho-phosphorique, de l'éthanol ainsi que le bleu de coomassie (BBC).. Ce réactif réagit avec le groupement (-NH<sub>2</sub>) des protéines. L'intensité de la couleur reflète la concentration des protéines se fait selon la méthode de Bradford (1976).

#### ❖ Préparation de la solution de Bradford

100mg de bleu coomassie G250+50ml éthanol 95%+100ml d'acide ortho phosphorique a 85%, agiter 30 min puis compléter le volume à 1litre par l'H<sub>2</sub>O (durée de conservation 1 mois)

### ❖ Procédure

Prélever 0.1 ml de l'homogénat.

- Ajouter 5 ml du réactif coloré (BBC).
- Agiter et laisser 5 min pour la stabilisation de couleur.

### ❖ Lecture

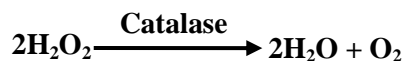
- Mesurer l'absorbance optique à 595nm contre un blanc contenant l'eau distillée à la place de l'homogénat.
- La densité optique obtenue est rapportée sur la courbe d'étalonnage préalablement tracé (0→1mg/ml de sérum albumine de bovin), (voir annexe).

## 2.6. Dosage de la catalase

### ❖ Principe

Les catalases sont présents dans un grand nombre de tissus. Ce sont des enzymes tétramériques,

Chaque unité portant une molécule d'hème et une molécule de NADPH. Ces enzymes interviennent dans la défense de la cellule contre le stress oxydant en éliminant les espèces réactives et en accélérant la réaction spontanée de l'hydrolyse du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) toxique pour la cellule en eau et en oxygène (Aebi., 1984).



### ❖ Protocol

- Prélever 20  $\mu$ l de l'homogénat.
- Ajouter 780  $\mu$ l (100 mM) de tampon phosphate pH 7.4, et 200  $\mu$ l d' $H_2O_2$  (500mM)

### ❖ Lecture

La lecture des absorbances est effectuée pendant une minute et chaque 15 secondes à une longueur d'onde de 240 nm contre un blanc contenant 20  $\mu$ l d'eau distillée remplaçant la quantité de surnageant.

### ❖ Calcul

$$\text{Activité CAT } (\mu\text{mol de } \frac{H_2O_2}{\text{min}} / \text{mg}) = \frac{\Delta D_0 \times d}{\varepsilon \times X \times L \times 0,02}$$

Avec :

- $\Delta D_0$ : Variation de la densité optique par minutes, c'est-à-dire pour :
- **AI** (Absorbance initiale) : 15 s



- **AF** (Absorbance finale) : 1min

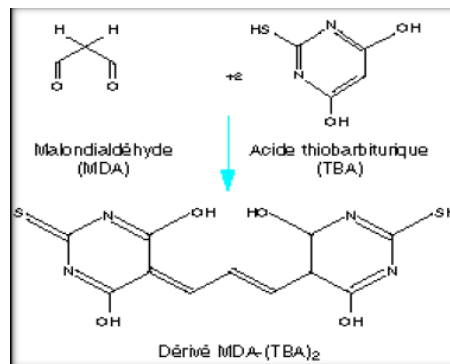
On fait :  $(AI - AF) \times 4/3$  par min

- **d** : dilution de l'échantillon au début
- **$\epsilon$**  : Coefficient d'extinction moléculaire de l'eau oxygénée,  $\epsilon_{H_2O_2} = 0.043 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} = 0,043 \mu\text{mol cm}^{-1}\text{ml}^{-1}$
- **L** : largeur de la cuve (longueur du Trajet optique) en cm
- **X** : quantité des protéines en mg/ml.

## 2.7. Dosage du malondialdéhyde

La MDA Peut être détecté par une réaction colorimétrique à l'acide Thiobarbiturique (TBA).

La détection du MDA issue de la dégradation des acides gras polyinsaturés à 3ou 4 double liaisons peroxydées, constitue une méthode très sensible pour déterminer une lipopéroxydation *in vitro*. Le dosage du MDA est réalisé selon la méthode **d'Esterbauer et al (1992)**.



**Figure 15.** Réaction du dialdéhyde malonique avec l'acide thiobarbiturique.

### ❖ Protocole

- Prélever 375 $\mu$ l de l'homogénat (surnageant).
- Ajouter 150  $\mu$ l de la solution tampon TBS (tris 50mM, NaCl150mM pH7.4).
- Ajouter 375  $\mu$ l de la solution TCA-BHT (TCA 20%, BHT 1%)
- Vortexer et centrifuger à 1000 tour/min pendant 10min.
- Prélever 400  $\mu$ l du surnageant.
- Ajouter 80  $\mu$ l du HCL 0.6 M.
- Ajouter 320  $\mu$ l de la solution tris-TBA (tris 26mM, TBA120mM).
- Mélanger et incuber au bain marie à une température de 80°C pendant 10 minutes.

La densité optique a été enregistrée à  $\lambda=530\text{nm}$ . L'absorbance est directement proportionnelle à la quantité de MDA formé, donnant ainsi une évaluation précise des lipides peroxydés.

### ❖ Calcul

La concentration de MDA est calculée selon la loi de Beer-Lambert ( $DO = \epsilon \cdot C \cdot L$ ) :

$$C \left( \frac{\text{nmol}}{\text{mg}} \text{ deprotéine} \right) = \frac{DO \cdot 10^6}{\epsilon \cdot L \cdot X \cdot Fd}$$

- **C** : Concentration en nmoles /mg de protéines;
- **DO** : Densité optique lue à 530 nm;
- **$\epsilon$**  : Coefficient d'extinction molaire du MDA =  $1.56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ;
- **L** : Longueur du trajet optique = 0.779 cm;
- **X** : Concentration de l'extrait en protéines (mg/ml);
- **Fd** : Facteur de dilution:  $Fd = 0.2083$ .

### D. Etude statistiques

Ces calculs ont été effectués à l'aide du logiciel MINITAB (Version 13.31) d'analyse et l'office Excel 2013.

Les résultats sont représentés sous la forme : moyenne  $\pm$  écart type moyenne et les différences ont été considérées significatives à  $p \leq 0.05$ .

## II. Résultats

### 2.1. Etude du poids corporel et poids relatif des reins

**Tableau 4 :** Variation du poids corporel PC (g) et du poids relatif PR (g/100g de poids corporel) des reins chez les souris témoins et traités après 21 jours de traitement.

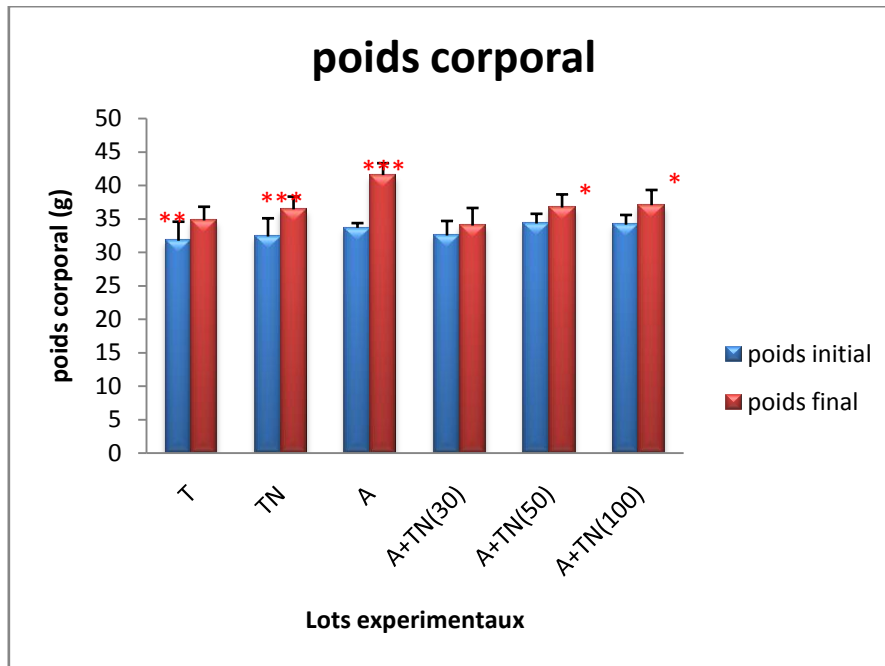
Paramètre	Lots expérimentaux					
	T (n=7)	TN (n=7)	A (n=7)	A+TN 30 (n=7)	A+TN50 (n=7)	A+TN 100 (n=7)
Poids initial (g)	31,71±2,84	32,34±2,72	33,64±0,70	32,49±2,17	34,29±1,44	34,11±1,45
Poids final (g)	34,74±2,048	36,40±1,89	41,52±1,77	33,98±2,62	36,67±1,96	37,03±2,26
Gain du poids (g)	3,032	4,062	7,88	1,49	2,382	2,91
Poids relatif des reins (%)	0,783±0,042	0,761±0,023	0,784±0,039	0,72±0,04 <sup>a***c*</sup>	0,83±0,001 <sup>d*</sup> **ac**	0,78±0,081

**a:** comparaison avec le lot T, **b:** comparaison avec le lot TN(50mg/kg), **c :** comparaison avec le lot A ,**d :** comparaison avec le lot A+T(30mg/kg), **e :** comparaison avec le lot A+T(50mg/kg), ( $p \leq 0.05$ ), **\*\*\*** ( $p \leq 0.001$ ) : comparaison avec le PI, **\*\*** ( $p \leq 0.01$ ).

#### 2.1.1. Poids corporel

D'après les résultats obtenus nous avons enregistré :

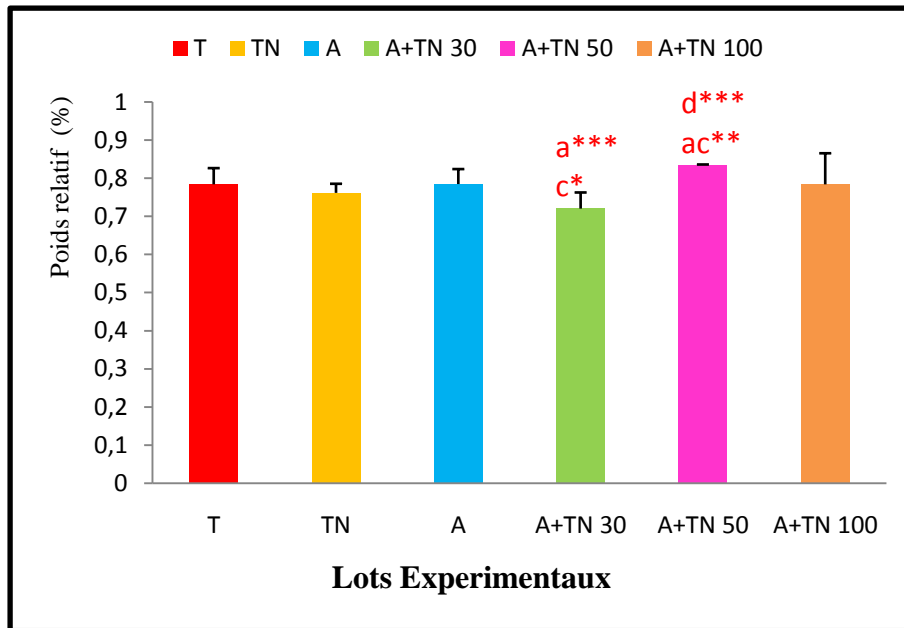
- une augmentation hautement significative ( $p \leq 0.01$ ) du poids corporel des souris témoins.
- une perturbation et augmentation très hautement significative ( $p \leq 0.001$ ) du poids corporel des souris traitées par le *thymus numidicus* et les souris alloxaniques comparés aux témoins sains.
- une augmentation significative du poids corporel des souris alloxaniques traités par le *thymus numidicus* à une dose de 50 et 100mg/kg/j (tab 04 figure 16).



**Figure 16 :** Evolution du poids corporel des souris témoins et des souris traitées pendant 21 jours de traitement.

### 2.1.2. Poids relatif des reins

Nos résultats montrent une diminution très hautement significative ( $p \leq 0.001$ ) du poids relatif des reins des souris alloxaniques traitées par le *Thymus numidicus* à une dose de 30mg/kg/j par rapport aux témoins, et aux souris alloxaniques traitées par la dose de 50mg/kg/j et significative par rapport aux souris alloxaniques, alors que pas de différence par rapport à la dose de 100mg/kg/j. (tab 04; fig17).



**Figure 17:** Evolution du poids relatif des reins (%) chez les souris témoins et traités après 21 jours du traitement. ( a: comparaison avec le lot T, b: comparaison avec le lot TN(50mg/kg), c: comparaison avec le lot A ,d : comparaison avec le lot A+TN(30mg/kg/j),.e: comparaison avec le lot A+TN(50mg/kg/j),\*:  $p \leq 0.05$ , \*\*:  $p \leq 0.01$ , \*\*\*:  $p \leq 0.001$ ).

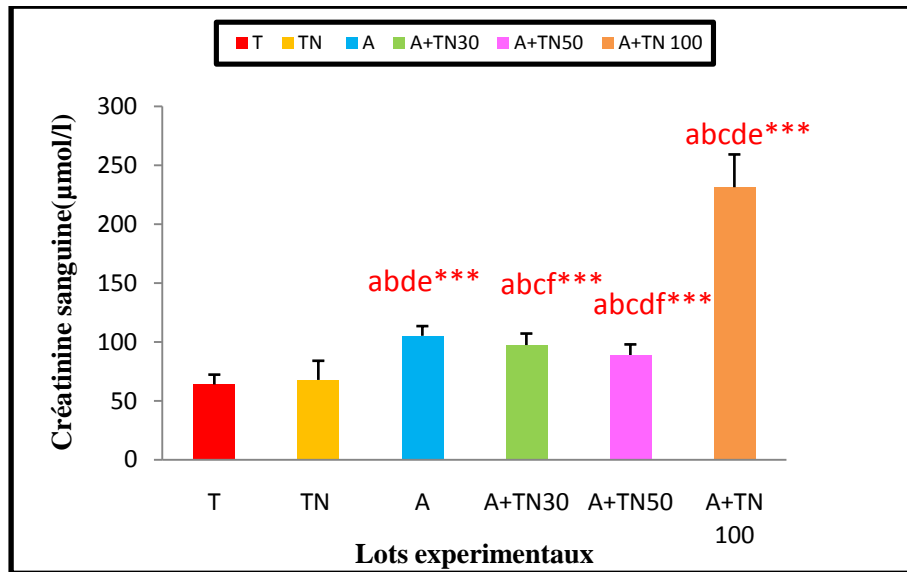
2.2. Etude des paramètres biochimiques

**Tableau 5:** Variation de la concentration sérique de l'urée, la créatinine, les protéines totales et le magnésium chez le lot témoin et les lots traités après 21 jours de traitement. (**a:** comparaison avec le lot T, **b:** comparaison avec le lot TN(50mg/kg), **c:** comparaison avec le lot A, **d:** comparaison avec le lot A+TN(30mg/kg/j), **e:** comparaison avec le lot A+TN(50mg/kg/j), ( $p \leq 0.05$ ),  $*** (p \leq 0.001)$ ,  $** (p \leq 0.01)$ ).

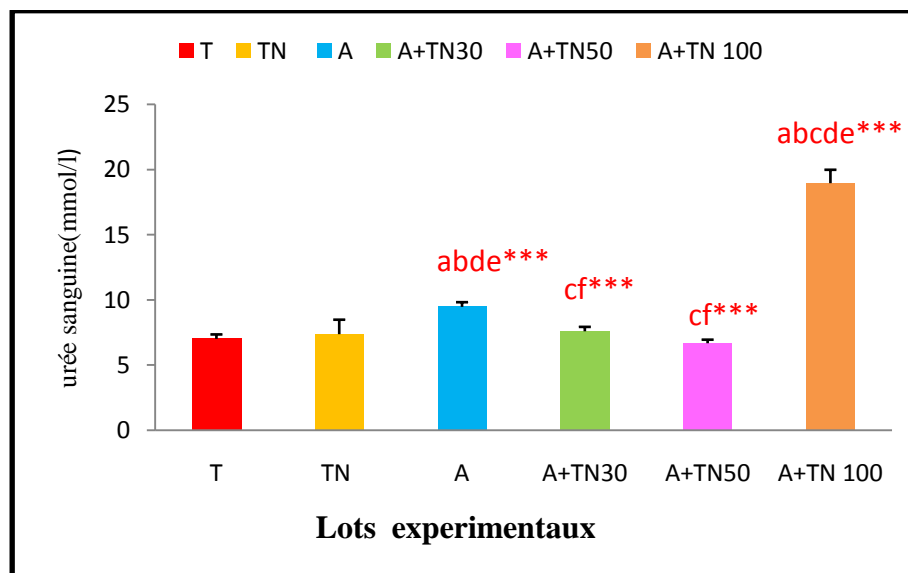
Paramétré	Lots expérimentaux					
	T (n=7)	TN (n=7)	A (n=7)	A+TN 30 (n=7)	A+TN50 (n=7)	A+TN 100 (n=7)
créatinine ( $\mu\text{mol/l}$ )	63,42 $\pm$ 0,3 3	67,85 $\pm$ 16,2 3 <sup>a**</sup>	105,28 $\pm$ 8,23 <sup>ab</sup> def <sup>***</sup>	97,42 $\pm$ 9,78 <sup>abcef***</sup>	89 $\pm$ 8,98 abcd <sup>***</sup>	234,2 $\pm$ 27,80 <sup>abcde*</sup> **
urée (mmol/l)	6,73 $\pm$ 0,544	6,94 $\pm$ 1,11	9,472 $\pm$ 0,35 abdef <sup>***</sup>	7,59 $\pm$ 0,33 cf <sup>***</sup>	6,68 $\pm$ 0,272 <sup>cf***</sup>	18,96 $\pm$ 1,029 <sup>abcde**</sup> *
Protéine total (g/l)	61,85 $\pm$ 0,27	64 $\pm$ 0,32	60,71 $\pm$ 0,26 <sup>de**</sup>	66,85 $\pm$ 0,19 acf <sup>**</sup>	68,57 $\pm$ 0,31 acf <sup>**</sup>	58,71 $\pm$ 0,46 de <sup>**</sup>
Magnésium (mmol/l)	1,92 $\pm$ 4,37	1,927 $\pm$ 5,13	1,65 $\pm$ 2,36 <sup>ab**</sup> def <sup>***</sup>	1,86 $\pm$ 3,13 <sup>c***</sup>	1,88 $\pm$ 5,028 <sup>c***</sup>	1,87 $\pm$ 0,0041 <sup>c***</sup>

2. 2.1 Urée et créatinine sanguines

D'après les résultats obtenus, on observe une augmentation très hautement significative ( $p \leq 0.001$ ) de la concentration sérique en urée et créatinine chez le lot alloxanique (150mg/kg) par rapport aux témoins sains et témoins traités par le *Thymus numidicus* (50mg/kg), alors que le traitement des souris alloxaniques par le *Thymus numidicus* à une dose de (30mg/kg/j) et (50mg/kg/J) pendant 21 jours présente une diminution très hautement significative ( $p \leq 0.001$ ) de la concentration sérique en urée et créatinine par rapport au lot alloxanique traitée par le *Thymus numidicus* à une dose de (100mg/kg/j). (Tab 5; fig 18, 19)



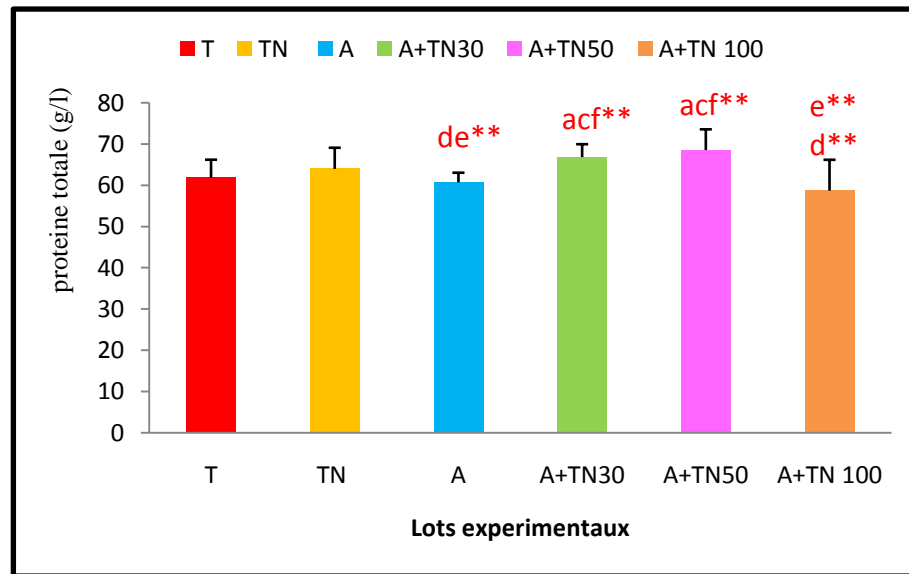
**Figure 18:** Variation de la concentration sérique de la créatinine chez les souris témoins et traités après 21 jours de traitement. ( **a**: comparaison avec le lot T, **b**: TN(50mg/kg):comparaison avec le lot TN, **c**: comparaison avec le lot A, **d**: comparaison avec le lot A+TN(30mg/kg/j)., **e**: comparaison avec le lot A+TN(50mg/kg/j),\*:  $p \leq 0.05$ , \*\*:  $p \leq 0.01$ ,\*\*\*:  $p \leq 0.001$ ).



**Figure 19.** Variation de la concentration sérique de l'urée chez les souris témoins et traités après 21 jours de traitement. ( **a**: comparaison avec le lot T, **b**: comparaison avec le lot TN(50mg/kg) ,**c**: comparaison avec le lot A ,**d**: comparaison avec le lot A+T(30mg/kg/J)., **e**: comparaison avec le lot A+T(50mg/kg/j),\*:  $p \leq 0.05$  ,\*\*\*:  $p \leq 0.001$  ) .

### 2.2.2. Protéines totales

On observe une augmentation hautement significative ( $p \leq 0.01$ ) des protéines totales chez les souris alloxaniques traitées par le *Thymus numidicus* à une dose de 30mg/kg/j et 50mg/kg/J pendant 21jours par rapport aux témoins sains et témoins alloxaniques et le lot alloxanique traité par le *Thymus numidicus* à une dose de 100mg/kg/j. (Tab 5; fig 20).

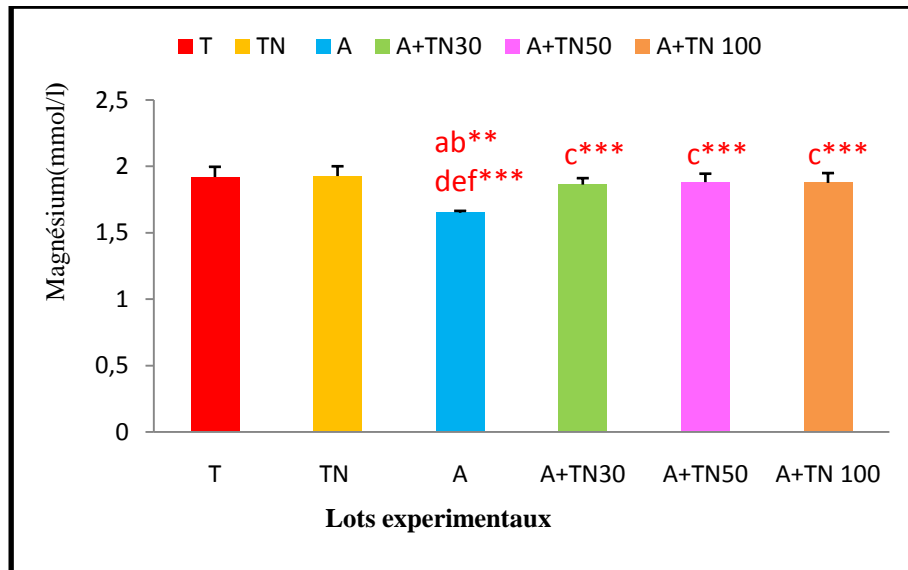


**Figure 20:** Variation de la concentration sérique en protéines totales (g/l) chez les souris témoins et traités après 21jours de traitement. **(a:** comparaison avec le lot T, **b:** comparaison avec le lot TN(50mg/kg), **c:** comparaison avec le lot A, **d:** comparaison avec le lot A+T (30mg/kg/J), **e:** comparaison avec le lot A+T (50mg/kg/j),\*:  $p \leq 0.05$ , \*\*:  $p \leq 0.01$ ).

### 2.2.3. Magnésium sanguin

Nos résultats montrent une diminution hautement significative ( $p \leq 0.01$ ) du magnésium chez le groupe alloxanique par rapport aux témoins saines et témoin traité par le *Thymus numidicus* 50mg/kg.et une diminution très hautement significative ( $p \leq 0.01$ ) par rapport aux souris alloxaniques traitées par le *Thymus numidicus* à une dose de 30 et 50 et 100 mg/kg/j (Tab 5; fig 21).





**Figure 21.** Variation du taux de magnésium sérique chez le lot témoin et les lots traités après 21 jours de traitement. (**a**: comparaison avec le lot T, **b**: comparaison avec le lot TN(50mg/kg), **c**: comparaison avec le lot A, **d**: comparaison avec le lot A+T(30mg/kg/J), **e**: comparaison avec le lot A+T(50mg/kg/j), \*\*:  $p \leq 0.01$ , \*\*\*:  $p \leq 0.001$ ).

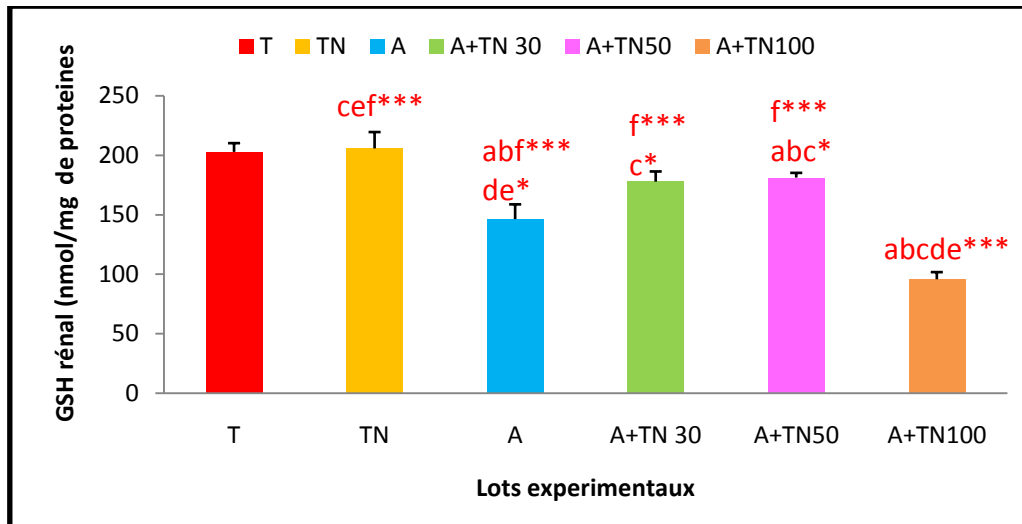
2.3. Etude des paramètres du stress oxydant

**Tableau 6:** Variation du glutathion (GSH), Malon dialdéhyde (MDA), l'activité enzymatique de la glutathion peroxydase (GPx), glutathion -S- transférase (GST), catalase (CAT) dans le tissu rénal, chez les souris témoins et traitées après 21 jours de traitement. (**a:** comparaison avec le lot T, **b:** comparaison avec le lot TN(50mg/kg), **c:** comparaison avec le lot A, **d:** comparaison avec le lot A+TN(30mg/kg/j), **e:** comparaison avec le lot A+TN(50mg/kg/j), \*(p≤0.05), \*\*\* (p≤0.001), \*\* (p≤0.01).

paramètre	Lots expérimentaux					
	T (n=7)	TN (n=7)	A (n=7)	A+TN 30 (n=7)	A+TN 50 (n=7)	A+TN 100 (n=7)
GSH (nmol/ mg de P)	202,79±7,35	205,73±13,7 6 ce <sup>f***</sup>	146,38±12,33 a b <sup>f***de*</sup>	177,77±8,58 f <sup>***c*</sup>	181,22±3,97 <sup>f*</sup> ** a b c *	95,77±6,01 <sup>a b c</sup> e <sup>***d**</sup>
GPx (µmol/ mg de P)	0,051±0,001365 89	0,055±0,000 93 <sup>acdef***</sup>	0,032± 0,0010 <sup>a bdef***</sup>	0,041± 0,00075 <sup>a b ce***</sup>	0,046± 0,001 <sup>a b c df***</sup>	0,027±0,0001 90 <sup>a b c d e****</sup>
GST (nmol/m n/mg de P)	0,158±0,015	0,163± 0,0079 <sup>cdef***</sup>	0,215± 0,0071 <sup>a bdef***</sup>	0,1936± 0,0080 <sup>bcef***</sup>	0,179± 0,0069 <sup>b c df***</sup>	0,223±0,0100 <sup>a</sup> bcde <sup>***</sup>
CAT (µmol H2O2/m n/mg de P)	94,65±6,60	98,31± 6,51 <sup>a**</sup> ade <sup>f***</sup>	63,26± 6,02 <sup>abdef***</sup>	74,56± 5,61 <sup>b cef***</sup>	89,46±4,09 <sup>b c</sup> df <sup>***</sup>	54,45714286± 6,82 <sup>a b c d e****</sup>
MDA (nmol/ mg de P)	94,65±0,15	1,86± 0,137 <sup>acdef***</sup>	2,89± 0,016 <sup>abdef***</sup>	2,47± 0,17 <sup>abcef***</sup>	2,15± 0,093 <sup>abcd<sup>f***</sup></sup>	2,97±0,20 <sup>a b c d</sup> e <sup>****</sup>

2.3.1. Glutathion réduit (GSH)

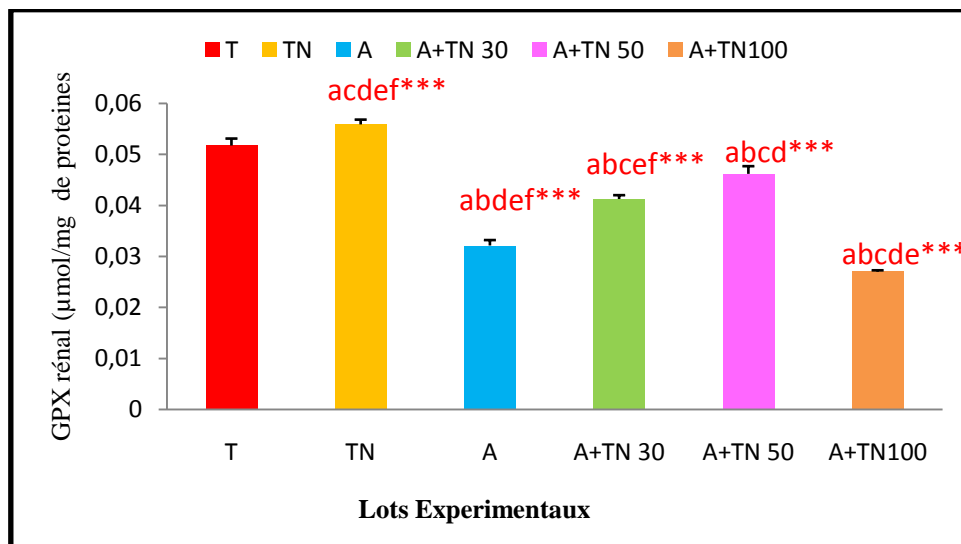
Nos résultats montrent une augmentation très hautement significative (p≤0.001) de la teneur du tissu rénal en GSH chez le lot alloxanique traité par le *Thymus numidicus* à une dose de 30et50mg/kg/j pendant 21jours comparé aux lot alloxanique et au le lot alloxanique traité par le *Thymus numidicus* à une dose de 100mg/kg/j (Tab 6; fig 22).



**Figure 22:** Variation du glutathion (nmol/mg de prot) dans le tissu rénal chez les souris témoins et traitées après 21 jours de traitement. ( **a**: comparaison avec le lot T, **b**: comparaison avec le lot TN(50mg/kg), **c**: comparaison avec le lot A ,**d**: comparaison avec le lot A+TN(30mg/kg/j),**e**: comparaison avec le lot A+TN(50mg/kg/j),\*\*\*:  $p \leq 0.001$  ).

### 2.3.2. Activité enzymatique de la glutathion peroxydase (GPx)

Nos résultats montrent augmentation très hautement significative ( $p \leq 0.001$ ) de la glutathion peroxydase (GPx) rénal chez le lot alloxanique traité par le *Thymus numidicus* à une dose 30et 50mg/kg/j pendant 21jours comparé aux lots alloxanique et au le lot alloxanique traité par le *Thymus numidicus* à une dose de 100mg/kg/j (Tab 6; fig 23).

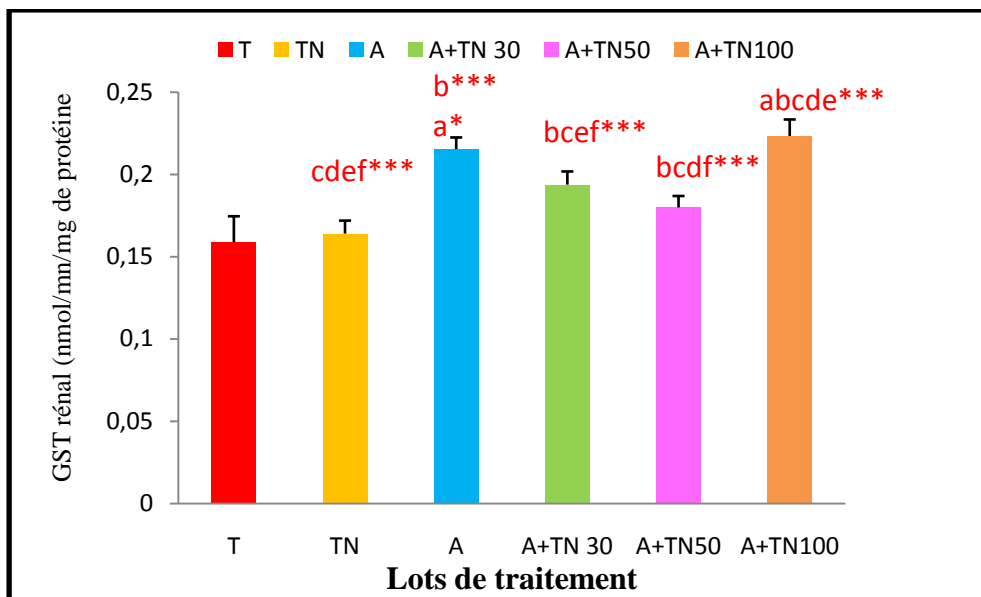


**Figure 23:** Variation de l'activité enzymatique de la glutathion peroxydase (µmol /mg prot) dans le tissu rénales chez les souris témoins et traitées après 21 jours de traitement. (**a**: comparaison avec le lot T, **b**: comparaison avec le lot TN(50mg/kg), **c**: comparaison avec le lot A ,**d**: comparaison avec le lot A+TN(30mg/kg/j), **e**: comparaison avec le lot A+TN(50mg/kg/j),\*\*\*:  $p \leq 0.001$  ).

### 2.3.3. Glutathion - S- transférase (GST)

Nos résultats montrent diminution très hautement significative ( $p \leq 0.001$ ) de l'activité enzymatique de la glutathion-S- transférase (GST) rénal chez le lot alloxanique traité par le *Thymus numidicus* à une dose 30 et 50mg/kg/j pendant 21 jours comparé au lot alloxanique.

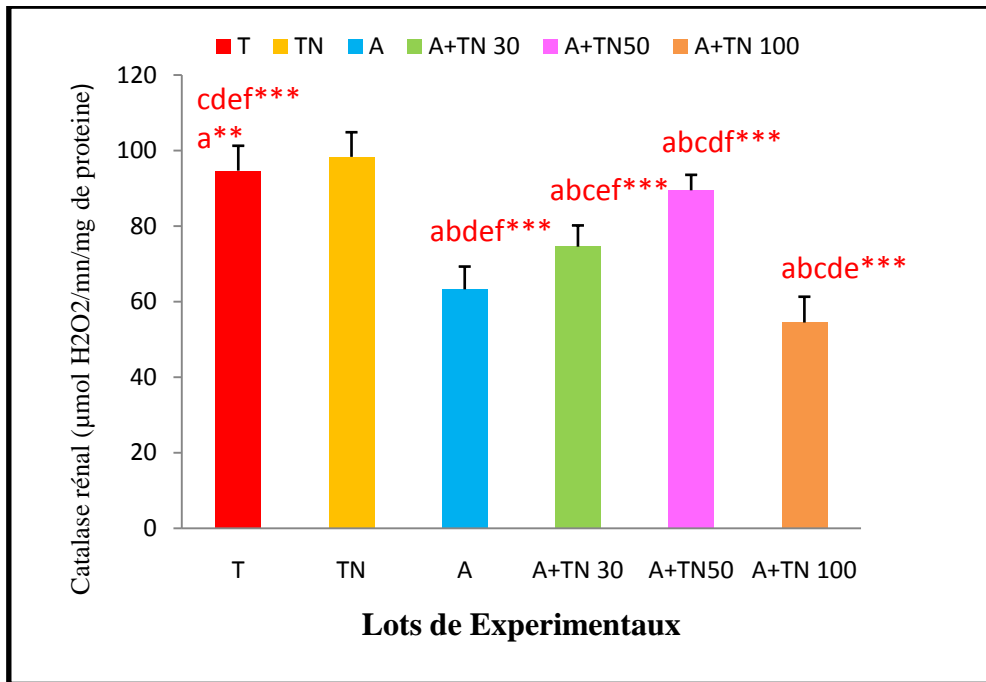
Nous avons enregistré une augmentation significative ( $p \leq 0.05$ ) de l'activité enzymatique de la glutathion-S- transférase (GST) rénal chez le lot alloxanique traité par le *Thymus numidicus* à une dose de 100mg/kg/j par rapport aux autres lots de traitement.



**Figure 24:** Variation de l'activité enzymatique de la glutathion –S-transférase (nmol/min/mg de prot) dans les tissus rénales chez les souris témoins et traitées après 10 jours de traitement. (a: comparaison avec le lot T, b: comparaison avec le lot TN(50mg/kg), c: comparaison avec le lot A ,d: comparaison avec le lot A+TN (30mg/kg/j)., e: comparaison avec le lot A+TN (50mg/kg/j),\*:  $p \leq 0.05$ ,\*\*\*:  $p \leq 0.001$ ).

### 2.3.4. Catalase

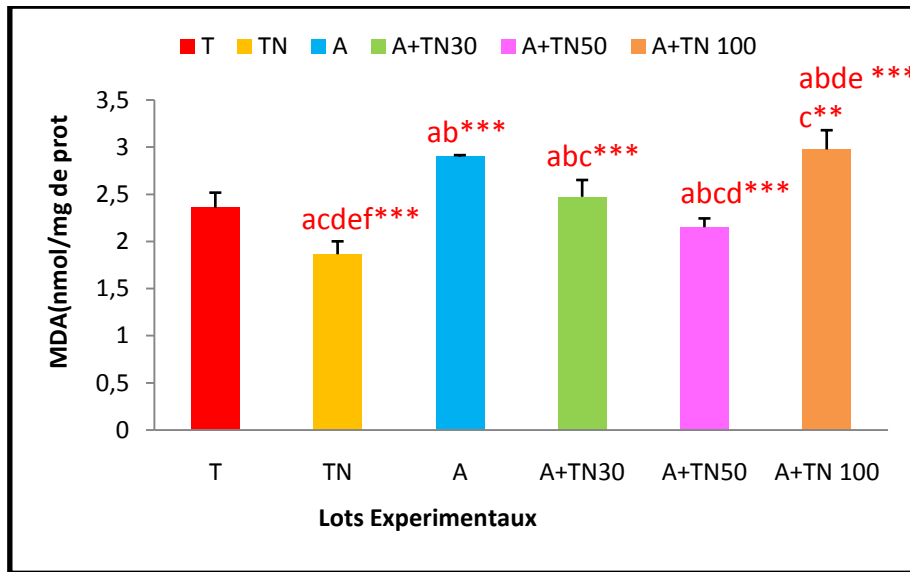
Nos résultats montrent une augmentation très hautement significative ( $p \leq 0.001$ ) de l'activité enzymatique de la catalase (CAT) rénal chez le lot alloxanique traité par le *Thymus numidicus* à une dose 30 et 50mg/kg/j pendant 21 jours par rapport aux lot alloxanique et au le lot alloxanique traité par le *Thymus numidicus* à une dose de 100mg/kg/j (Tab 6; fig 25).



**Figure 25:** Variation de l'activité de la catalase rénal ( $\mu\text{mol} / \text{min} / \text{mg} \text{ prot}$ ) chez les souris témoins et traités après 21 jours de traitement. ( **a**: comparaison avec le lot T, **b**: comparaison avec le lot TN(50mg/kg), **c**: comparaison avec le lot A ,**d**: comparaison avec le lot A+TN(30mg/kg/j),. **e**: comparaison avec le lot A+TN(50mg/kg/j), \*\*,  $p \leq 0.01$ , \*\*\*,  $p \leq 0.001$ ).

### 2.3.5. Malondialdéhyde (MDA)

Nos résultats montrent une diminution très hautement significative ( $p \leq 0.001$ ) du taux de MDA dans les tissus rénal chez les souris alloxaniques traitées par le *Thymus numidicus* à une dose 30et50mg/kg/j pendant 21jours par rapport aux le lot alloxanique et au le lot alloxanique traité par le *Thymus numidicus* à une dose de 100mg/kg/j (Tab 6; fig 26).



**Figure 26:** Variation de Malon dialdéhyde (nmol/mg prot) dans les tissus rénal aux les souris témoins et traités après 21 jours de traitement. (**a:** comparaison avec le lot T, **b:** comparaison avec le lot TN(50mg/kg), **c:** comparaison avec le lot A, **d:** comparaison avec le lot A+TN(30mg/kg/j), **e:** comparaison avec le lot A+TN(50mg/kg/j), \*\*:  $p \leq 0.01$ , \*\*\*:  $p \leq 0.001$ ).

# Discussions

Le monde des sciences biologiques et médicales est envahi par un nouveau concept, celui du «stress oxydant», qui se définit comme un déséquilibre entre la production des radicaux libre et leurs éliminations par les défenses anti oxydantes.( **Favier., 2003**).

L'alloxane induit la formation d'espèces réactives de l'oxygène (des radicaux superoxydes, le peroxyde d'hydrogène et des radicaux hydroxyles) (**Duncan et al., 2012**).

le stress oxydant peut être réduit par plusieurs métabolites secondaires isolés de plantes qui montrent une activité antioxydante.

L'extrait aqueux de *Thymus numidicus* est un mélange complexe dont le principe actif responsable de l'activité antioxydante peut être soit une molécule soit une combinaison de substances. et les études littéraires sur *Thymus numidicus* révèlent la présence de plusieurs molécules connues par leurs capacités antioxydantes (**Djeddi et al., 2015; Zeghib et al., 2013**). comme les polyphénols, les tanins et les flavonoïdes. Il est admis que ces composés notamment les flavonoïdes présentent une activité antioxydante importante.

Les polyphénols et surtout les flavonoïdes sont des antioxydants puissants susceptibles d'inhiber la formation des radicaux libres et de s'opposer à l'oxydation des macromolécules (**Van Acker et al., 1995**). Les flavonoïdes peuvent aussi inhiber des lipoxygénases qui catalysent l'oxydation d'acide arachidonique en acides gras polyinsaturés (**Mladinka et al., 2010**).

les flavonoïdes sont oxydés par les radicaux, conduisant la formation du radical plus stable et moins réactif. En d'autres termes, les flavonoïdes stabilisent les ERO en réagissant avec les composés réactifs du radical. les radicaux sont rendus inactif à cause de la haute réactivité du groupe hydroxyle des flavonoïdes ( **Nijveldt et Coll., 2001**).

### **1. Effet du *Thymus numidicus* sur le poids corporel et le poids relatif des reins**

L'analyse des résultats établit une perturbation et augmentation très hautement significative ( $p \leq 0.001$ ) du poids corporel des souris alloxaniques comparés aux témoins sains, est due à l'anabolisme, plus particulièrement des lipides.

Tandis que les souris traitées par le *Thymus numidicus* ont subi une augmentation du poids corporel comparées aux souris témoins saines. Cette hausse du poids pourrait être liée à une stimulation de l'appétit des animaux par l'extrait, et qui aurait pour conséquence une augmentation de leur consommation de nourriture. Ce même résultat a en effet été obtenu par : **Djedioui., (2010)** sur des rats traités pendant 20 jours avec l'extrait aqueux de *Inula viscosa*.



En revanche, les souris alloxaniques traitées par le *Thymus numidicus* à une dose de 50mg/kg/j montrent une diminution du poids corporel jusqu'au poids normal, cette diminution est due à l'effet protecteur du *Thymus numidicus*.

Cette étude ne montre aucune différence du poids relatif des reins chez les souris alloxaniques, ce qui est en accord avec l'étude réalisée par **Boussekine., (2014)**. Par contre nous avons remarqué une augmentation très hautement significative du poids relatif des reins des souris traitées par le *Thymus numidicus* à une dose de 50mg/kg/j. Ceci est explicable par l'hypertrophie tissulaire des reins causés par l'alloxane et la dose de 50mg/kg/j .

### **2. Effet du *Thymus numidicus* sur les paramètres biochimiques sanguins**

La créatinine et l'urée: sont produits de dégradation du métabolisme protéique. Ils sont éliminés par les reins, et utilisés généralement comme indicateur d'une fonction rénale correcte. Lorsqu'une insuffisance rénale s'installe, les taux sérique de ces paramètres augmentent, (**Boukerche et al., 2007; Almadal et Vilstrup., 1988**). Ces données expliquent l'augmentation de la concentration sérique en urée et créatinine chez les souris alloxaniques par rapport au témoins, les protéines peuvent être dégradées en acides aminés puis en urée et créatinine. Ceci est confirmé par la diminution des protéines totales dans le sérum, donc l'augmentation de l'urée et de la créatinine chez les souris alloxaniques .

Nos résultats démontrent le rôle bénéfique du *Thymus numidicus* sur la fonction rénale, d'où nous avons enregistré une normalisation du bilan rénal étudié (urée, créatinine) après le traitement des souris alloxaniques par le *Thymus numidicus* à une dose (30et50mg/kg/j), Nos résultats sont en accord avec ceux de **Akila., (2012)**.

Nous a conduits à penser soit à l'amélioration des changements rénaux chez les souris, soit à la diminution du catabolisme de la créatine et la phosphocréatine au niveau des muscles par le biais des flavonoïdes. Nos résultats sont en accord avec ceux de (**Palsamy et Subramanian., 2008**) et aussi nous a permis de suggérer le rôle prophylactique de la plante sur le métabolisme des protéines et son effet préventif contre les dommages hépatiques et le dysfonctionnement rénal.

Nos résultats ont montré une augmentation de la concentration sérique en urée et créatinine chez les souris alloxaniques traitées par le *Thymus numidicus* (100mg/kg/j) par rapport aux autres lots de traitement, permis de suggérer la dose 100mg/kg/j c'est une dose toxique et la combinaison avec l'alloxane donne un effet synergique, ce qui explique la dégradation des protéines en acides aminés puis en urée et créatinine (**Prangthip et al., 2012**).

L'analyse des résultats a montré une diminution importante des protéines totales chez les souris alloxaniques cette réduction est expliquée par le fait que la plus part des protéines possèdent des groupements (SH, OH) ces dernières réagissent très facilement avec les radicaux libres générés par l'alloxane et par conséquent ces protéines peuvent se dénaturer et se fragmenter (**Nermeen et al., 2010**). Le traitement des souris alloxanique par le *Thymus numidicus* à une doses (30et50mg/kg/j) diminuée l'effet toxique de l'alloxane. Ceci est confirmé par l'augmentation de taux des protéines par rapport aux souris traités par l'alloxane.

Nos résultats montrent une diminution hautement significative de la concentration sérique du magnésium chez les souris alloxaniques .Cette baisse du magnésium est dû à une diminution de la réabsorption tubulaire (**Flechet., 1990**).

### 3. Effet du *Thymus numidicus* sur les paramètres biochimiques tissulaires

L'organisme se protège en permanence contre la formation et l'agression de l'oxydants grâce à divers mécanismes de défense tant enzymatiques que non enzymatiques (**Halliwell., 1994**). Parmi ces derniers, on retrouve principalement le glutathion réduit (GSH) : c'est un puissant antioxydant, important pour la protection cellulaire, la désintoxication des ERO, la conjugaison et l'excrétion des molécules toxiques (**Brown et al., 2004**). C'est un piègeur direct des radicaux libres, un cosubstrat nécessaire pour l'activité GPx et la GST (**Ravi et al., 2004**).

Lors du traitement des animaux par l'alloxane, les taux de GSH sont nettement diminuées suite à leur action de neutralisation des radicaux libres générés par l'alloxane (**Huk et al., 1998**) ce phénomène aussi provoque sa déplétion et facilite la peroxydation des lipides et l'oxydation des groupements thiols des protéines (**Lopez-Lazaro et al., 2000**). L'alloxane interagit directement avec une forte affinité aux groupements thiols (-SH) du GSH (**Szkudelski., 2001; Nermeen et al., 2010**). Donc peu de GSH est produit. Et une augmentation du glutathion oxydé (GSSG), et par conséquent une diminution de l'activité des enzymes GSH-dépendantes. Par ailleurs, le traitement des souris alloxanique par le *Thymus numidicus* à une dose de 30et50mg/kg/j à amélioré les niveaux de GSH dans les reins .ce même traitement à une dose de 50 mg/kg/j provoqué également une augmentation de la concentration rénal en GSH chez les souris saines par rapport aux témoins. Ces résultats sont en accord avec ceux publiés par **Pari et Latha, (2005)** qui ont constaté que chez des rats rendus diabétiques par STZ un traitement de 21 jours par un extrait aqueux de *Scoparia dulcis* provoque une augmentation hautement significative du taux rénal en GSH. ceci est due a l'influence des composés bioactifs présents dans les plantes, tels que les flavonoïde

Qui ont un effet scavenger, c'est-à-dire au lieu que les radicaux libres produits par l'alloxane (**Quinlan et Gutteridge., 1988; Huk et al., 1998**) et les composés polyphénoliques sont connus par leurs capacités de recycler la vitamine E et de piéger les radicaux libres cela peut donc participer directement dans la réduction de l'utilisation du GSH (**Babu et al., 2006**).

GPx c'est une enzyme dépendante de sélénium, elle décompose le peroxyde d'hydrogène en eau et oxygène moléculaire par l'oxydation du glutathion réduit (**Ewis and Abdel-Rahman., 1995**). au cour de étude expérimentale, nous avons constaté une diminution significative de l'activité enzymatique de la glutathion peroxydase (GPx) dans le tissus rénal chez les souris alloxaniques , cette baisse d'activité pourrait être directement expliquée par la faible concentration du glutathion ;car ce dernier est un substrat et cofacteur de GPx (**Ramachandran et Saravanan., 2013**).

Le traitement des souris alloxaniques par le *Thymus numidicus* à une doses (30 et 50mg/kg/j). Provoque une augmentation de l'activité de GPx .l'augmentation de l'activité de GPx est due à la présence des composés bioactifs dans le *Thymus numidicus* notamment les polyphénols, qui un rôle protecteur contre les différentes pathologies. Leur nature chimique fait de ces composés des agents réducteurs et ce sont, par ailleurs, les antioxydants les plus abondants dans notre alimentation (**Derbel et Ghedita., 2005**).

La glutathion S-transférase est une enzyme ayant un rôle important dans la désintoxication des xénobiotiques et la protection contre les métabolites nocifs générés après la dégradation des macromolécules (**Hayes et Pulford., 1995**). Ce que nous expliquent les résultats obtenus et l'augmentation avec une déférence très hautement significative de l'activité enzymatique de la GST dans les tissus rénaux chez les souris alloxaniques .ces résultats s'accordent aux travaux de **Boussekine., (2014)**. L'augmentation de l'activite de cette enzyme est une réponse physiologique pour compenser les altérations qui sont dus aux radicaux libres (**Nuriye et Belma., 2005**). La supplémentation du *Thymus numidicus* à un dose (30et50 mg/kg/j) réduit considérablement le l'activité du GST.

La catalase (CAT) est une hémoprotéine qui catalyse la réduction des peroxydes d'hydrogène en H<sub>2</sub>O et en oxygène et protège les tissus des radicaux hydroxyles qui sont très réactifs (**Sathishsekar et Subramanian., 2005**). On a enregistré une diminution significative de l'activité du catalase au niveau des reins. ces résultats s'accordent aux travaux **Manonmani et ces collaborateurs (2005)**, cette réduction peut être due a la production excessive d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Ils l'ont expliquée comme étant le résultat de la glycation non enzymatique (**Rajasekaran et al., 2005**).le traitement des souris alloxaniques par le *Thymus numidicus* à

une doses (30et50mg/kg/j) provoque une augmentation de l'activité de CAT. Ceci est dû à l'effet antioxydant de cette plante. Ces résultats sont en accord avec ceux publiés par **Kebièche et al (2011)** qui ont constaté que chez des rats rendus diabétiques par l'alloxane un traitement de par un extrait aqueux de *Ranunculus repens L*, maintiennent l'activité enzymatique (CAT) à leur niveau cellulaire normal.

MDA, c'est le produit de la peroxydation des acides gras insaturés, utilisé comme indicateur des dommages oxydatifs (**Zhang et al., 2008**). Notre recherche montre une augmentation significative de la teneur rénal de MDA chez les souris alloxaniques nos résultats sont en accord avec ceux présentés par (**Kakkar et al., 1998; Singh et al., 2005**). On a constaté que le traitement des souris alloxaniques par *Thymus numidicus* à une dose (30et50 mg/kg/j) provoque une diminution de la concentration rénale en MDA. Nos résultats se concordent avec plusieurs études comme celle publiée par **Pari et Latha., (2005)** qui ont constaté que, chez des rats rendus diabétiques par STZ, un traitement de 21 jours par un extrait aqueux de *Scoparia dulcis* provoque une diminution hautement significative du taux rénale en MDA.

La thymoquinone et d'autres antioxydants été testés sur souris ayant une néphrotoxicité induite par le cisplatine ou la ciclosporine A. La thymoquinone a eu les meilleurs résultats, ce sont ses propriétés inhibitrices de la peroxydation lipidique microsomale et stimulantes des polynucléaires qui protégeraient de l'action des radicaux libres (**Ragheb., 2009**).

Par contre les souris alloxaniques traité par le *Thymus numidicus* à une doses (100 mg/kg/j) révèle une augmentation du taux rénal en MDA permis de suggérer la dose 100mg/kg/j c'est un dose toxique et la combinaison avec l'alloxane donne un effet synergique.

Le stress oxydant provoque un déséquilibre de la balance redox provenant de l'augmentation de la production des ERO par la glycation et la peroxydation lipidique, et la diminution de la défense antioxydants. Tous ces facteurs nous ont conduits à suggérer que les antioxydants, en piégeant les ERO, ont maintenu l'équilibre de la balance antioxydant/prooxydant des cellules rénales. Cet équilibre est maintenu sous l'effet de l'action antioxydante des composés de *Thymus numidicus* contre les ERO générés par l'alloxane, et le pouvoir antiradicalaire déjà prouvé *in vitro* avec le DPPH° par les travailles de (**Djeddi et al., 2015; Zeghib et al., 2013**).

# Conclusion

Ce travail nous a permis de mettre en évidence l'effet des extraits aqueux de *Thymus numidicus* sur l'évolution du poids corporel, ainsi que le bilan biochimique sanguin et le statut redox d'autre part.

Les résultats obtenus ont montré l'effet bénéfiques de cette plante, à la lumière des résultats obtenus, on peut conclure que :

L'injection intra péritonéale de l'alloxane à 150 mg/ kg du poids corporel chez les souris mâles adultes a induit des perturbations des paramètres biochimiques sanguins et tissulaire procès accompagné par une augmentation pondérale remarquable.

Nos résultats montrent que l'extrait de la plante provoque une amélioration de bilan biochimique sanguin et une nette amélioration du statut antioxydant rénal. En effet, la diminution de la concentration du MDA, l'augmentation du taux du glutathion réduit (GSH), de l'activité de la GPx et de l'activité de la catalase (CAT) et la diminution de l'activité enzymatique de GST dans les reins chez les souris alloxanique traités par l'extrait montrent clairement les propriétés antioxydantes de l'extrait aqueux de *Thymus numidicus*. Ces résultats laissent un grand espoir pour l'avenir avec le rôle protecteur que peuvent conférer le *Thymus numidicus* dans la prévention et la limitation des effets toxiques des radicaux libres.

# Références bibliographiques

1. ([http://www.doctissimo.fr/html/sante/phytotherapie/plante\\_medicinale/thym.htm](http://www.doctissimo.fr/html/sante/phytotherapie/plante_medicinale/thym.htm))
2. **Aebi. Catalase.** In: **L. Packer (Ed).** *methods in enzymology*, Academic pres, Orlando.1984. 121-126.
3. **Ahmed Kabouche.** Etude phytochimique de plantes médicinales appartenant à la famille des Lamiaceae. Université Mentouri-Constantine, **2005**. P 277.
4. **Almadal, T.P and Vilstrup, H.** Strict insulin treatment normalizes the organic nitrogen contents and the capacity of urea-N synthesis in experimental diabetes in rats *Diabetologica*; 31.**1988**.114-118.
5. **Ammon HP., Hagele R., Youssif N.** A possible role of intracellulaire and membrane thiols of rat pancreatic islets in calcium uptake and insulin release. *Endocrinology*. 112.**1983**. 720-6.
6. **AndersonH., R and StittA.,W.** Induction of alloxan / streptozotocin diabetes in dogs: a revised experimental technique *Lab. Anim*; 27.**1993**. 281-285.
7. **Armelle Judde** .Prévention de l'oxydation des acides gras dans un produit cosmétique :mécanismes, conséquences, moyens de mesure, quels antioxydants pour quelles applications . Rue Monge.*Parc Industriel Bersol*. **2004**.414-418.
8. **Atamer A, Bilici A, Yenice N, Selek S, Ilhan N & Atamer Y.**The importance of paraoxonase 1 activity, nitric oxide and lipid peroxidation in hepatosteatosis. *J Int Med Res* 36.**2008**. 771-776.
9. **AviramM., RosenblatM., BisgaierC.L., NewtonR.S., Primo-ParmoS.L., La Du,B.N.** Paraonase inhibits high-density lipoprotein oxidation and preserves its functions. A possible peroxidative role for paraonase. *J Clin Invest* .101.1998. 1581-1590.
10. **Babu PVA., Sabitha KS., Shyamaladevi CS.** Therapeutic effect of green tea extract on oxidative stress in aorta and heart of streptozotocin diabetic rats. *Chemico-Biological Interactions*, **162.2006**. 114 - 120.
11. **Bazylko A., et Strzelecka H.** A HPTLC densitometric determination of luteolin in *Thymus vulgaris* and its extracts *Fitotherapia*.78.**2007**. 391-395.
12. **BENAYACHE Feryal.** Etude phytochimique et biologique del'espèce *Thymus numidicus* Poiret. Université Constantine 1 Faculte Des Sciences Exactes.**2013**.p 59.
13. **Benjamin Dubois.** implication du stress oxydant dans plusieurs affections du cheval athlete. l'université claud-bernard - Lyoni .**2015** .P 50,56.



14. **Blandine Garait.** Le stress oxydant induit par voie métabolique (régimes alimentaires) ou par voie gazeuse (hyperoxie) et effet de la GliSODin®. l'université Joseph Fourier DISCIPLINE.2006.P 24.
15. **Bouhouche I.** Etude comparative de l'alloxane et de la streptozocine dans le diabète expérimental chez le rat blanc. Etude histologique du pancréas endocrine et la variation des paramètres sanguins. Université Constantine 1 Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie.2014.P 21.
16. **Boukerche S, Aouacheri W, Saka S.** The toxic effects of nitrates: biological study in humans and animals. *Ann. Biol. Clin.*65.2007. 385-391.
17. **Boussekine Samira .** Contribution a l'étude de l'effet du sélénium sur le mécanisme biochimique chez le diabète expérimental. Université Badji Mokhtar.2014.
18. **Bradford, M.** A rapid and sensitive method for the quantities of microgram quantities of protein utilizing the principle of proteinbinding, *Anal. Biochem.* 72.1976. 248–254.
19. **Brown L.A., HarrisF.L., Ping X.D., GauthierT.W.**Chronic ethanol ingestion and the risk of acute lung injury: A role for glutathione availability. *Alcohol* 33.2004.191-197.
20. **C. Groussard.**stress oxydative and anaerobic exercise *.Science & Sports.*62–67.
21. **C. Pasquier.** stress oxydatif et inflammation. *Revue française des laboratoires.*1995.87-92.
22. **Christo Hilan., Rabiha Sfeir et Souad Aitour.** Chimiotypes de plantes Communes au liban du genre origanum et du genre micromeria (LAMIACEAE). *Lebanese Science Journal*, Vol. 12.2010.79-91.
23. **Clémentine Poisson.**Role du stress oxydant au niveau hépatique et rénale dans la toxicité de l'uranium après exposition chronique . UNIVERSITÉ PARIS-SUD 11 .2013.P 121,133.
24. **Cosentino S., Palmas F.** In vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian Thymus essential oils. *Letters in Applied Microbiology*, 29.1999.130— 135.
25. **Crapo JD.** Mouse extracellular superoxide dismutase: primary structure, tissuespecific gene expression, chromosomal localization, and lung in situ hybridization. *Am J. Respir Cell Mol Biol.*17.1997. 393 - 403.
26. **D Riche.**Pratique sportive et oligoéléments : conséquences nutritionnelles *Science & Sports.*11.1996. 211-222.

27. **D. Haj Mouhameda., A. Ezzaher., F. Neffati ., W. Doukia, L. Gahab.,M.F. Najjar.** Étude d'un marqueur du stress oxydant chez les fumeurs : le malondialdéhyde. *Immuno-analyse et biologie spécialisée*.27.**2012**.153—158.
28. **Dalle-Donne I., ROSSI R., Colombo R., Giustarini D., Milzani A.** Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clin. Chem: 52*.**2006**.601-623.
29. **Davies, M. J., and Slater., T. F.**Studies on the metal-ion and lipoxygenase-catalysed breakdown of hydroperoxides using electron-spin-resonance spectroscopy. *The Biochemical journal* .245. **1987**.167-73.
30. **Davies, M. J., Fu, S., and Dean, R. T.** Protein hydroperoxides can give rise to reactive free radicals. *The Biochemical journal* .305 .**1995**. 643-9.
31. **Davis, W., Jr., Ronai, Z., and Tew, K. D.** Cellular thiols and reactive oxygen species in drug-induced apoptosis. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 296.**2001**. 1-6.
32. **Delattre J., Beaudoux JL., Bonnefont-Rousselot.** Radicaux libres et stress oxydant: aspects biologiques et pathologiques. Lavoisier édition TEC & DOC éditions *médicales internationales Paris* .**2005**.1 - 405.
33. **Derbel S. et Ghedira K.** Les phytonutriments et leur impact sur la santé Phytothérapie.1.**2005**.28-34.
34. **Dietz K-J.** The Dual Function of Plant Peroxiredoxins in Antioxidant Defence and Redox Signaling. *Peroxiredoxin Systems*.**2007**. 267-294.
35. **Duncan M., Matheka A., Morris Kitua., A Faraj., O Alkizim. A.** Peculiar glycemc patterns in alloxaninduced diabetes animal model. Matheka et al. *Afr. J. Pharmacol. Ther.1.* **2012**.30-34.
36. **E. Descamps., P. Gelé., R. Bordet., J. Vamecq .** Modulation pharmacologique du stress oxydatif Pharmacological control of oxidative stress *.La Lettre du Pharmacologue - vol. 20.* **2006**.107-118.
37. **Economou K. D., Oreopoulou V., Thomoupoulos C. D.** Antioxidant properties of some plant extract of the Labiatae family. *J Am. Chem. Soc.* 68.**1991**.109— 113.
38. **Esterbauer H., GebickiJ., Puhl H., JungensG.** The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radic. Biol. Med.***1992**. 13, 341.
39. **Ewis, S.A., Abdel-Rahman, M.S.** Effect of metformin on glutathione and magnesium in normal and streptozotocininduced diabetic rats. *Applied Toxicology* 15.**1995**. 387–390.

40. **Falleti, O.** Les adduits des produits de la peroxydation lipidique sur les bases de l'ADN comme biomarqueurs du stress oxydant. Thèse effectuée au laboratoire des lésionsz des Acides Nucléiques (LAN). CEA de Grenoble.**2007**.
41. **Fatmi Wided** . L'effet de la vitamine C et le sélénium sur le développement de diabète chez les rats alimentés par un régime alimentaire carencé en zinc. Université Badji Mokhtar Annaba.**2014**.P 5.
42. **Favier. A.** Le stress oxydant : Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique, l'actualité chimique, *Mécanismes biochimiques*.**2003**.108-115.
43. **Flechet, B.** Guide des Analyses Spécialisées, Laboratoires CERBA. Dans la Banque Télématique de la Société Française de Biologie Clinique.**1990**.
44. **Flohe, L., Gunzler, W.A.** Analysis of glutathione peroxidase, *Methods Enzymol.* 105.**1984**. 114–121.
45. **Furukawa, A., Hiraku, Y., Oikawa, S., Luxford, C., Davies, M. J., and Kawanishi, S.** Guanine-specific DNA damage induced by gamma-irradiated histone. *The Biochemical journal.* 388.**2005**. 813-8.
46. **Gebicki, S., and Gebicki, J. M.** Crosslinking of DNA and proteins induced by protein hydroperoxides. *The Biochemical journal* .338.**1999**.629-36.
47. **Gherman C., Culea M., and Cozar O.** Comparative analysis of some active principles of herb plants by GC/MS. 53.**2000**. pp: 253-62.
48. **Ginseng**.**2013**. [mr-ginseng.com/thym/](http://mr-ginseng.com/thym/).
49. **Goudable J., Favier A.** Radicaux libres oxygénés et antioxydants. *Nutr Clin Mdtabol*, 11.**1997**.115 - 120.
50. **Grankvist K., Marklund SL., Taljedal IB.** CuZn-superoxide dismutase, Mnsuperoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in pancreatic islets and other tissues in the mouse. *Biochem. J.*199.**1981**. 393-398.
51. **Grochot-Przeczek A., DulakJ., Jozkowicz A.** "Haem oxygenase-1: non-canonical roles in physiology and pathology. *Clin Sci (Lond)* .122.**2012**. 93-103.
52. **HabigW.H., PabstM.J., Jacobi, W.B.** (1974). The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J.Biol. Chem.* 249.**1974**.7130-7139.
53. **Halliwell B.** Free radicals, reactive oxygen species and human disease: a critical evaluation with special reference to atherosclerosis. *Br J Exp Pathol*.70.**1989**. 737 - 757.

54. **Hayes JD, Pulford DJ.** The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drugresistance. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*30.**1995**.445-600.
55. **Hayes JD., Pulford DJ.**The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit Rev Biochem Mol Biol* .30.**1995**.445-600.
56. <http://www.passeportsante.net/fr/Nutrition/EncyclopedieAliments>).
57. **Huk I., Brokovich V., Nanobashvili J., Weigel G., Neumayer C., Partika L., Patton N.**
58. **I.Gabriell., F. Allemané., V. Dufourcque., F. Perriné., J.-F. Gabarroué .** Utilisation des huiles essentielles en alimentation des volailles. 2. Hypothèses sur les modes d'action impliqués dans les effets observés INRA Prod. *Anim.*26.**2013**.13-24.
59. **Imen Ben El Hadj Ali., Radhia Bahri, Maher Chaouachi., Mohamed Boussaïd., Fethia Harzallah-Skhirib.** Phenolic content, antioxidant and allelopathic activities of variousextracts of *Thymus numidicus* Poir. *Organs. Industrial Crops and Products* .62.**2014**.188–195.
60. **J. Haleng ., J. Pincemail ., J.O. Defraigne ., C. Charlier., J.P. Chapelle.** Le stress oxydant. *Rev Med Liege*.62 : 10 .**2007**. 628-638.
61. **J.-L. Beaudoux ., J. Delattre., P. Therond., D. Bonnefont-Rousselot., A. Legrand., J. Peynet.** Le stress oxydant, composante physiopathologique de l'athérosclérose . *Immuno-analyse & Biologie spécialisée* 21.**2006**.144-150.
62. **J.-L. Beaudoux., J. Delattre., P. Therond., D. Bonnefont-Rousselot., A. Legrand., J. Peynet.**Le stress oxydant, composante physiopathologique de l'athérosclérose . *Immuno-analyse & Biologie spécialisée*. 21.**2006**.144-150.
63. **J.L. Cracowski., F. Stanke-Labesque., G. Bessard .**Isoprostanes : nouveaux marqueurs du stress oxydant. Aspects fondamentaux et cliniques.*Rev Méd Interne*.21.**2000**.304-307.
64. **J.O. Defraigne ., J. Pincemail.** Stress oxydant et antioxydants:mythes et réalités. *Rev Med Liege* . 62 : 4.**2007**.1-10.
65. **Josiane CILLARD.,Pierre CILLARD.** Mécanismes de la peroxydation lipidique et des anti-oxydations. DOSSIER Laboratoire de biologie cellulaire et végétale.*Faculté de pharmacie*.**2006**.24-29.
66. **Kabouche A ., Z. Kabouche.,and C. Bruneau.**Analysis of the essential oil of *Thymus numidicus* (Poiret). *Flavour Fragr. J.* **2005**; 20: 235-236.

67. **Kakkar R., Mantha S.V., Radhi J., Prasad k., Kalra J.** Increased oxidative stress in rat liver and pancreas during progression of streptozotocin-induced diabetes. *J Clin Sci.*946 .1998.23-32.
68. **Kaplan A.Urea. Kaplan A et al.** Clin Chem The C.V. Mosby Co. St Louis. Toronto. Princeton.1984.1257-1260.
69. **L.Massias., C.Stoltz., V .Stella et E .Postaire.** dosage du pentane alvolaire , marqueur du stress oxydatif .*Revue frangaise des laboratoires.* 276 .1995.101-105.
70. **Laurent Lagadic, Thierry Caquet, Jean-Claude Amiard, Francois Ramade.** biomarqueurs en écotoxicologie aspects fondamentaux. MASSON éditeur .1997. P 125.
71. **Lee S. H., and Blair I.A.** Characterization of 4-oxo-2-nonenal as a novel product of lipid peroxidation. *Chemical research in toxicology.*13.2000. 698-702.
72. **Lee S. H., Rindgen, D., BibleR. H., Jr., Hajdu E., Blair I. A.** Characterization of 2'-deoxyadenosine adducts derived from 4-oxo-2-nonenal, a novel product of lipid peroxidation. *Chemical research in toxicology* .13.2000. 565-74.
73. **Lee, S. H., Arora, J. A., Oe, T., and Blair, I. A.** 4-Hydroperoxy-2-nonenal-induced formation of 1,N2-etheno-2'-deoxyguanosine adducts. *Chemical research in toxicology* .18.2005. 780-786.
74. **Lenzen S., Drinkgern J., Tiedge M.**Low antioxidant enzyme gene expression in pancreatic islets compared with various other mouse tissues. *Free Radic Biol Med.* 20. 1996 463-6.
75. **Libor Vítek.**Ther ole of bilirubin in diabetes,metabolic syndrome,and cardiovascular diseases .*REVIEW ARTICLE.*10.3389/fphar.2012. 1-7.
76. **Lopez-Lazaro M., Martin-Cordero C., Ayuso M., J.** Two new flavonol glycosides as DNA topoisomerase I poison. *Z Naturforsch,* 55 (11-12). 2000.898-902.
77. **Lunzen S** .alloxan and streptozotocin diabetes. [EN ligne] [[http://www.saw-leipzig.de/forschung/projekte/zeitstrukturen-endokriner-systeme/endokrinologieiii/endo\\_07-lenzen.pdf](http://www.saw-leipzig.de/forschung/projekte/zeitstrukturen-endokriner-systeme/endokrinologieiii/endo_07-lenzen.pdf)] (Consulté le 25/12/ 2012).
78. **Luxford C., DeanR. T., and Davies M. J.** Induction of DNA damage by oxidized amino acids and proteins. *Biogerontology.* 3.2002. 95-102.
79. **M. Kebièche1., Z. Lakroun1., Z. Mraïhi2., R. Soulimani.**effet antidiabétogène et cytoprotecteur de l'extrait butanolique de *Ranunculus repens* L. et de la quercétine sur un modèle expérimental de diabète alloxanique *Phytothérapie* ,*Springer-Verlag* France.9.2001.274-282.

80. **Malinski T.** Bioflavonoid quercetin scavenger superoxide and increases nitric oxide concentration in ischemia-reperfusion injury: an experimental study. *Brit J Surg.*85.1998. 1080-1085
81. **Manonmani G., Bhavapriya V., Kalpana S., Govindasamy S and Apparamantham T.** Antioxidant activity of Cassia fistula (liun) flowers in aloxan induced diabetic rats: *Journal of Ethnopharmacology.*97.2005.39-42.
82. **Mebarki N.** Extraction de l'huile essentielle de thymus fontanesii et application a la formulation d'une forme médicamenteuse-antimicrobienne. Université –M'Hamed Bougara-Boumerdes.2010.
83. **Medjdoub H.** Contribution à la recherche d'éventuelles activités biologiques de Zygophyllum geslini Coss. Université Abou Bekr Belkaid. Laboratoire de Recherche sur les Substances Naturelles et Bioactives (Lasnabio). 2013.p31.
84. **Mette M. Berger.** Manipulations nutritionnelles du stress oxydant état des connaissances Nutritional manipulation of oxidative stress:review of the evidence. *Nutrition clinique et métabolisme* 20.2006. 48–53.
85. **Mette M., Berger.** Rôle antioxydant des micronutriments :pertinence en épidémiologie et en réanimation. *Nutr Clin Mbtabol* .11.1997.125-32.
86. **Miller R. E., Mc Conville M. J. et Woodrow I. E.** Cyanogenic glycosides from the rare Australian endemic rainforest tree Clerodendrum grayi (Lamiaceae) *Photochemistry.*2006. 67. pp 43-51.
87. **Miura K., Kikuzaki H., & Nakatani N.** Antioxidant Activity Of Chemical Components from sage(salvia officinalis L.) and thyme (thymus vulgaris L.) Measured by the oil stability index Method. *Agric. Food Chem.* 50. 2002. 1845-1851.
88. **Mladinka P., Zatloukalova L., Filipsky T. and Hrdina R.** *Free Radical Biology & Medicine;* 49.2010.963-975.
89. **Murray R.L., Creatinine., Kaplan A et al.** *Clin Chem* The C.V. Mosby Co. St Louis.Toronto. Princeton.1984. 1261-1266.
90. **N'guessan k., Soro d., Kouassi k.e., Amoikon k.e., Djaman a.j., Traore d.** Effet de l'extrait des racines de jatropha gossypiifolia sur la glycémie chez le lapin diabétique *j. sci. pharm. biol.* Vol.9 . 2008.13-21.
91. **Naghibi F., Mosaddegh M., Mohamed S.M. et Ghorbani A.** *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 4.2005. pp: 63-79.
92. **Navrot N., V Collin., J Gualberto., E Gelhaye., M Hirasawa., P Rey., DB Knaff., E Issakidis, J-P Jacquot and N Rouhier.** Plant Glutathione Peroxidases Are

- Functional Peroxiredoxins Distributed in Several Subcellular Compartments and Regulated during Biotic and Abiotic Stresses. *Plant Physiology* .142.**2006**. 1364-1379.
- 93. Nermeen M., Shaffie., Fatma A., Morsy., Amina G., Ali., Hafiza A., Sharaf.** Effect of Caway, Coriander and Fennel on the structure of Kidney and Islets of Langerhan in Alloxan-Induced Diabetic Rats: *Histological and Histochemical Study.Pathology Department*.**2010**.27-40.
- 94. Nijveldt J.R., Nood E.,Hoorn D., Boelens P.G., NorrenK., Leewen P.**Flavonoids:a review of probable mechanisms of action and potential applications, *Am J Clin Nutr*, 74.**2001**.418-25.
- 95. Nuriye Nuray Ulusu and Belma Turan.** Beneficial effects of selenium on some enzymes of diabetic rats heart. Humana Press Inc. Biological trace element research. Vol, 103.**2005**. 207-215.
- 96. P. Léophonte., J.-C. Guérin., F.-X. Lebas ., F. Liard ., P. Boulanger.** Stress oxydatif et BPCO. Rôle des infections. Prévention *Médecine et maladies infectieuses* .36 .**2006**. 245–252.
- 97. Packer L., Tritschler HJ and Wessel K.** Neuroprotection by the metabolic antioxidant alpha-lipoic acid.*Free Radic Biol Med* .22.**1997**. 359-378.
- 98. Palsamy P and Subramanian S.** Resveratrol, a natural phytoalexin, normalizes hyperglycemia in STZ-nicotinamide induced experimental diabetic rats *biomedicine pharmacotherapy*.62.**2008**.598-605.
- 99. Pari L, Latha M.** Antidiabetic effect of *Scoparia dulcis*: effect on lipid peroxidation in streptozotocin diabetes. *Gen Physiol Biophys*, 24.**2005**.13 - 26.
- 100. Pari L., Latha M.** Antidiabetic effect of *Scoparia dulcis*: effect on lipid peroxidation in streptozotocin diabetes. *Gen Physiol Biophys*.**24** .**2005**13 - 26.
- 101. Pedersen S.N., Pedersen K.L., Højrup, P., DepledgeM.H., KnudsenJ.** Primary structures of decapod crustacean metallothioneins with special emphasis on freshwater and semi-terrestrial species. *Biochemical Journal*.319 .**1996**.999-1003.
- 102. Pollack, M., Oe, T., Lee, S. H., Silva Elipe, M. V., Arison, B. H., and Blair, I. A.** Characterization of 2'-deoxycytidine adducts derived from 4-oxo-2-nonenal, a novel lipid peroxidation product. *Chemical research in toxicology* 16.**2003**.893-900.
- 103. Powers S.K., Smuder A.J., Kavazis A.N., Hudson M.B.**Experimental guidelines for studies designed to investigate te impact of antioxidant supplementation on exercise performance. *Int. J. Sport Nutr. Exerc. Metab*.**2010**.20, 2-14.



104. **Prangthip, P., Surasiang, R., Charoensiri, R., Leardkamolkarn, V., Komindr, S., Yamborisut, U., Vanavichit, A., Kongkachuichai, R.** Amelioration of hyperglycemia, hyperlipidemia, oxidative stress and inflammation in streptozotocin-induced diabetic rats fed a high fat diet by riceberry supplement. *Functional Foods* .5 .2012.195–203.
105. **Quinlan G., Gutteridge J.** Hydroxyl radical generation by the tetracycline antibiotics with free radical damage to DNA, lipids, carbohydrates carbohydrates in the presence of iron and copper salts. *Biol Med*.5. 1988.341–8.
106. **R. Benkiniouar., A. Touil., F. Zaidi., S. Rhouati.,E. Chosson., E. Seguin., G. Comte., F. Bellvert.** Isolation and identification of five free flavonoid aglycones from *Thymus numidicus* . J.Soc.Alger.Chim.20.2010.11-15.
107. **Ragheba., Attia A., Eldin W., Elbarbry F. S., & Shoker A.** The protective effect of thymoquinone, an anti-oxidant and anti-inflammatory agent, against renal injury: A review. *Saudi J Kidney Dis Transpl*.20.2009. 742-752.
108. **Rajasekaran, S., Sivagnanam, K., Subramanian, S.** Antioxidant effect of Aloe vera gel extract in streptozotocin induced diabetic rats. *Pharmacological Reports* .57.2005.90-96.
109. **Ramachandran, V., Saravanan, R.** Asiatic acid prevents lipid peroxidation and improves antioxidant status in rats with streptozotocin-induced diabetes. *Functional Foods* .5.2013. 1077-1087.
110. **Ravi K, Ramachandran B, Subramanian S.** Effect of *Eugenia Jambolana* seed kernel on antioxidant defense system in streptozotocin-induced diabetes in rats. *Life Sciences*.75.2004.2717 – 2731.
111. **Robert Barouki** . Stress oxydant et vieillissement. *MEDECINE/SCIENCES* . 22 .2006.266-72.
112. **Ruberto G., Biondi D., Ciana P., Geraci** .Antimicrobial activity and chemical composition of essential oils from Sicilian aromatic plants. *Flavour and Fragrance J*, 8.1993. 331 —337.
113. **S. Louala, A. Benyahia-Mostefaoui , M.Y. Lamri-Senhadj.** La restriction énergétique réduit le stress oxydant de l'aorte et du coeur et corrige le risque athérogène chez le rat rendu obèse , *Annales de Cardiologie et d'Angéiologie* .62.2013.155–160.
114. **Samah Djeddi ,Elina Yannakopoulou., Kyriakos Papadopoulos et Helen Skaltsa.** Activités anti-radicalaires de l'huile essentielle et des extraits bruts de *Thymus numidicus* Poiret., Algérie. *Afrique Science* 11.2015.58 – 65.



115. **Sathishsekar D, Subramanian S** .Antioxidant properties of *Momordica Charantia*(bitter gourd) seeds on Streptozotocin induced diabetic rats. *Asia Pac J Clin Nutr* ,14 (2) . **2005**. 153 - 158.
116. **Shinobu Hayashi., Rina Takamiya., Tokio Yamaguchi., Kenji Matsumoto., Shinichiro J. Tojo.,Takuya Tamatani., Masaki Kitajima., Nobuya Makino., Yuzuru Ishimura., Makoto Suematsu** .Induction of Heme Oxygenase-1 Suppresses Venular Leukocyte Adhesion Elicited by Oxidative Stress Role of Bilirubin Generated by the Enzyme.**1999**.664-671.
117. **Singh N., Kamath V and Rajini P.S.** A H enuation of hyperglycemia and associated biochemical parameter in STZ induced diabetic rats by dietary supplementation of potato peel powder. *Clinica chemical Acta*.353.**2005**.165-175.
118. **Skulachev VP**. Cytochrome c in the apoptotic and antioxidant cascades. *FEBS Lett* .423.**1998**. 275-280.
119. **Squier T. C.** Oxidative stress and protein aggregation during biological aging. *Experimental gerontology* 36.**2001**. 1539-50.
120. **Srinivasan VA., Raghavan VA., Parthasarathy S.**Biochemical basis and clinical consequences of glucolipototoxicity: a primer.*Heart Fail Clin*. 8.**2012**.501-11.
121. **Susana F., Llesuy., Maria L., Tomaro** .Heme oxygenase and oxidative stress. Evidence of involvement of bilirubin as physiological protector against oxidative damage. *Biochimica et Biophysica Acta* .1223.**1994**. 9-14.
122. **Szkudelski T.** The Mechanism of Alloxan and Streptozotocin Action in B Cells of the Rat Pancreas. *Physiol. Res*.50. **2001**. 536-546.
123. **T. Lemkecher a., S. Dartigues a., J.Vaysse b., O. Kulski a.,V. Barraud-Lange a.,L. Gattegno b, J.-P.Wolf** . Leucocytospermia, oxidative stress and male fertility: facts and hypotheses . *Gynécologie Obstétrique & Fertilité* .33.**2005**.2–10.
124. **Ternes W., Gronemeyer H., Schwarz K.** Determination of p-cymene-2,3-diol, thymol and carvacrol in différent food stuffs. *Z. Lebnsn. Unters. Forsch.*, 201.**1995**. 544 - 547.
125. **ThornalleyP.J., Vasak M.** Possible role for metallothionein in protection against radiation-induced oxidative stress. Kinetics and mechanism of its reaction with superoxide and hydroxyl radicals. *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology*. 827.**1985**. 36-44.
126. **Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M. T., MazurM., and TelserJ.** Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 39.**2007**.44-84.

127. **Van Acker S.A.B.E., van den Berg D.J., Tromp M.N.J.L., Griffioen D.H., van Bennekom W.P., van der Vijgh W.J.F., Bast A.** Structural aspect of antioxidant activity of flavonoids. *Free Rad. Biol. Med.* 20.**1996**.331-342.
128. **Vertuani S., Angusti A., and Manfredini S.** the Antioxidants and Pro-Antioxidants Network: An Overview. *curr.pharm.des.*10. **2004**.1677-1694.
129. **Weckbeker, G., Cory, J.G.** Ribonucleotide reeducates activity and growth of Glutathione-depleted mouse leukemia L1210 cells in vitro. *Cancer letters.* 40.**1988**.257-264.
130. **Xuemei Zhang., Wenbo Liang ., Yiqing Mao ., Hui Li ., Yang Yang ., Huanran Tan.** Hepatic glucokinase activity is the primary defect in alloxan-induced diabetes of mice. *Biomedicine & Pharmacotherapy* xx.**2007**.1-7.
131. **Y. Ménézo., F. Entezami., I. Lichtblau ., M. Cohen., S. Belloc., M. Brack .** Stress oxydant et fertilité : fausses évidences et mauvaises recettes. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité* 40 .**2012**.787–796.
132. **Yuliya Lytvyn HBSc ., Bruce A., Perkins MD., MPH., David Z.I. Cherney MD., PhD.** Uric Acid as a Biomarker and a Therapeutic Target in Diabetes. *Review Can J Diabetes* 39.**2015**.239-246.
133. **Zeghad N.** Etude du contenu polyphénolique de deux plantes médicinales d'intérêt économique (*Thymus vulgaris*, *Rosmarinus officinalis*) et évaluation de leur activité antibactérienne. Université Mentouri Constantine.**2009**. PP :7
134. **Zeghib A., Laggoune S., Kabouche A., Semra Z., Smati F., Touzani R and Kabouche Z.** Composition, antibacterial and antioxidant activity of the essential oil of *Thymus numidicus* Poiret from Constantine (Algeria). *Der Pharmacia Lettre.*6. 2013.206-210.
135. **Zelko IN., Mariani TJ., Folz RJ .** Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Rad Biol Med.* 33.**2002**. 337–349.
136. **Zhang, F., Xu, Z., Gao, J., Xu, B., Deng, Y.** In vitro effect of manganese chloride exposure on energy metabolism and oxidative damage of mitochondria isolated from rat brain. *Environmental Toxicology and Pharmacology* **26**.**2008**. 232-236.

# Annexes

## 1. Courbe d'étalonnage des protéines tissulaires utilisant le sérum albumine bovine (BSA).

