



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 des 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

**Option: Toxicologie:** xénobiotique et risque toxicologique

### Thème:

# CONTRIBUTION A L'ETUDE DE L'EFFET DU *THYMUS NUMIDICUS* SUR L'HEPATOTOXICITE INDUITE PAR L'ALLOXANE CHEZ LA SOURIS

### Présenté par:

Benkhedir Abdelkarim et Bennedjoue Madiha

### Devant le jury:

Mr. Rouabhi Rachid	Prof	U.L.T. Tébessa	Président
Mme. Boussekine Samira	M.C.B	U.L.T. Tébessa	Rapporteur
Mme. Hamel Mahdia	M.A.A	U.L.T. Tébessa	Examineur

**Date de soutenance:** 29/05/2016

**Note :**

**Mention :**



بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



الإجهاد التأكسدي هو في الأساس عدم التوازن بين إنتاج الجذور الحرة و قدرة الجسم على مواجهة و إزالة آثارها الضارة من خلال تحييدها بواسطة مضادات الأكسدة.

ففي بداية القرن العشرين تم التركيز على الأعشاب كمصدر لمضادات الأكسدة و التي يمكن إستخدامها لتعزيز و تحسين أداء نظام مضادات الأكسدة، ونذكر منها الزعتر.

من هذا المنظار تهدف دراستنا إلى البحث عن مدى تأثير الزعتر على عملية الإجهاد التأكسدي و دوره في حماية الكبد من الإجهاد التأكسدي المسبب من طرف الألوكسان.

أجريت هذه التجربة في المخبر على 42 فأر ذكر مقسمة إلى ستة ( 6 ) مجموعات ذوات سبع فأران: الشاهد، الشاهد المعالج بالألوكسان 150مغ/كغ عن طريق الحقن تحت الصفاق ، الشاهد المعالج بالزعتر 50مغ/كغ، وثلاثة مجموعات بعد الحقن تحت الصفاق 150مغ/كغ من مادة الألوكسان ، تم حقن جرعات مختلفة من الزعتر على التوالي: 30مغ/كغ، 50مغ/كغ، 100مغ/كغ وكل هذا لمدة 21 يوم.

النتائج أثبتت أن الحيوانات المعالجة بمادة الألوكسان شهدت زيادة كبيرة في الوزن ، على عكس الكبد الذي شهد تراجعاً كبيراً في الوزن ، لاحظنا كذلك إختلال واضح في انزيمات النقل الأمينية والفوسفاتاز القاعدي بالمقابل إنخفاض المغنزيوم.

بالإضافة إلى أن الألوكسان مولد للأكسدة حيث بينت النتائج انخفاض شديد في نشاط الأنزيمات المضادة (GPx, CAT)، ومستوى الجلوتاثيون، إرتفاع في مستوى (GST) ونسبة المالونديليدهيد (MDA) في الكبد.

أما عند حقن الزعتر وخاصة الجرعة 50مغ/كغ لاحظنا تحسن بعض المؤشرات البيوكيميائية الدموية والنسيجية (النسيج الكبدي)، وهذا يعني أن الزعتر يخفف الضرر الناتج عن الألوكسان.

ومن هنا يمكننا القول أن الزعتر مضاد للأكسدة وفعال في الموازنة بين الجذور الحرة والنظام المضاد للأكسدة الجسم.

**الكلمات المفتاحية:** ألوكسان، الإجهاد التأكسدي، الكبد، مضادات الأكسدة، المؤشرات البيوكيميائية.

*Thymus numidicus* is a plant used in traditional medicine to treat diseases related to oxidative stress it so as an enzyme generator of ROS that may cause hepatotoxicity. We used alloxan as a generator of free radicals what will we evaluated the effect of *Thymus numidicus* plant.

In this context, our work focuses on the study of the protective effect of *Thymus nemudicus* on the state of oxidative stress and the occurrence of liver toxicity induced by this molecule in mice. This is an experimental laboratory study conducted on 42 male mice of the BALB / C divided into six lots of seven rats each, the first batch serves as control (C), the second undergoes an intraperitoneal injection of the *Thymus numidicus* liquor 50mg / kg / day, the 3rd undergoes a single injection of alloxan 150 mg / kg, and the last 3 batches undergoes injection combination; alloxan 150 mg / kg single dose and different *Thymus numidicus* doses 30 mg / kg / day, 50 mg / kg / day and 100 mg / kg / j specific to each batch and this for 21 days. Analysis of the results shows that alloxan to cause:

- A significant increase in the enzymatic activity of transaminases and alkaline phosphatase;
- A depleted serum magnesium levels;
- A depletion of GSH tissue (liver tissue);
- A decrease of the enzymatic activity of catalase, glutathione peroxidase;
- An increase in the activity of GST;
- An increase in lipid peroxidation.

After the treatment with *Thymus numidicus* to almost normalize biochemical parameters studied, with protection of liver tissue radical attacks caused by alloxan especially in the combination A + TN 50 mg / kg / day against the combination A + TN 100 mg / kg / day potentiates the toxicity therefore it can be concluded that the *Thymus numidicus* has a protective effect on hepatocytes at the dose of 50 mg / kg / day against certain doses may potentiate the hepatotoxicity as the dose of 100 mg / kg.

**Keywords:** alloxan, Oxidative stress, Antioxidant, *Thymus numidicus*, biochemical parameters, liver tissue.

*Thymus numidicus* est une plante utilisée en médecine traditionnelle pour traité certaines maladies liées au stress oxydatif ce dernier sorte comme un moteur générateur des ERO ce qu'il peut entraîner une hépatotoxicité. Au cours de notre travail nous avons utilisé l'alloxane comme générateur des radicaux libres ce qu'il va nous permis d'évaluer l'effet de la plante *Thymus numidicus*.

Dans ce contexte, notre travail a porte sur l'étude de l'effet protecteur du *Thymus nemudicus* sur l'état du stress oxydatif et l'apparition la toxicité hépatique induite par ce molécule chez les souris. Il s'agit d'une étude expérimentale menée au laboratoire sur 42 souris mâles de la souche BALB/C répartis en six lots de sept rats chacun dont le premier lot sert de témoin (T), le second subit une injection intra-péritonéale de la liqueur de thymus numidicus 50mg/kg/j, le 3éme subit une injection unique d'alloxane 150 mg/kg, et les 3 derniers lots ont subit une combinaison d'injection ; alloxane 150 mg/kg dose unique et des différentes doses de thymus numidicus 30 mg /kg/j, 50 mg/kg/j et 100 mg/kg/j spécifique à chaque lot et ceci pendant 21 jours. L'analyse des résultats montre que l'alloxane à provoquer :

- Une augmentation significative de l'activité enzymatique des transaminases et de la phosphatase alcaline ;
- Un épuisement du taux de magnésium sérique ;
- une déplétion du GSH tissulaire (tissu hépatique) ;
- une diminution de l'activité enzymatique de Catalase, de la glutathion peroxydase ;
- Une augmentation de l'activité de GST ;
- Une augmentation de la peroxydation lipidique.

Après le traitement par le *Thymus numidicus* à presque normaliser les paramètres biochimiques étudiés, avec protection du tissu hépatique des attaques radicalaires provoquées par l'alloxane surtout chez la combinaison A+TN 50 mg/kg /j par contre la combinaison A+TN 100 mg/kg/j potentialise la toxicité donc on peut conclure que le *Thymus numidicus* a un effet protecteur des hépatocytes à la dose de 50 mg/kg/j par contre certaines doses peut potentialiser l'hépatotoxicité comme la dose de 100 mg/kg.

**Mots clés:** Alloxane, Stress oxydant, Antioxydant, *Thymus numidicus*, Paramètres biochimiques, tissu hépatique.

## *Remerciement*

*En préambule à ce mémoire nous remerciant "ALLAH" qui nous aide et nous donne la patience et le courage durant ces longues années d'étude.*

*Mes remerciements vont tout d'abord au corps professoral et administratif de la Faculté de la science de la nature et la vie et science exactes pour la richesse et la qualité de leur enseignement et qui déploient de grands efforts pour assurer à leurs étudiants une formation actualisée.*

*Nous tenant à remercier sincèrement Dr Boussikin, qui, en tant que promotrice de mémoire, qui est toujours montrée à l'écoute et très disponible tout au long de la réalisation de ce mémoire.*

*Nous souhaitant adresser nos remerciements les plus sincères aux personnes qui nous ont apporté leur aide et qui ont contribué à l'élaboration de ce mémoire ainsi qu'à la réussite de cette formidable année universitaire sur tout Souad technicienne de laboratoire.*

*Un grand merci pour moi et Binomati Madiha*



## *Dédicace*

*Merci Allah (mon dieu) de m'avoir donné la capacité d'écrire bout de rêve et de bonheur de lever mes mains vers le ciel et de dire " ya kayoum ".*

*Je dédie ce modeste travail à celle qui m'a donné la vie, le symbole de tendresse, qui s'est sacrifiée pour mon bonheur et ma réussite, à ma mère.*

*A mon père, école de mon enfance, qui a été mon ombre durant toutes les années des études, et qui a veillé tout au long de ma vie à m'encourager, à me donner l'aide et à me protéger.*

*Et aussi Dr Boussikjn. S qu'il a fait preuve d'une patience et a été un grand apport pour la réalisation de ce travail ses conseils ses orientations ainsi que son soutien moral et scientifique. Son encadrement était de plus exemplaire.*

*Mes très chères frères et sœurs, spécialement ma très chère sœur « Ahlem » qui m'aidez m'encouragez et qui sentenu dans les moments difficiles.*

*Mon amie « Karima » que j'aime beaucoup et je fier d'eux et que j'étais la plus belle dans la vie.*

*Tout le membre de ma famille grande et petite.*

*Et particulièrement à mes oncles: Mohammed et son Marié hoda, Ali, Mon condisciple et frère A.Elkarim (binomi).*

*A mes très chers amis: fatma, salim, lenda, sabrin... et tout le promotion de toxicologie :xénobiotique et risque toxicologie mastre 2.*

*Madiha*



## *Dédicace*

*Je dédie ce modeste travail à mes chers parents Saleh et Moufida  
Pour leur aide et encouragement tout au long de la réalisation de ce mémoire.*

*A mes soeurs Rabab, Zohra.*

*Pour le soutien qu'ils m'ont apporté.*

*A mes amis : Nor, Islem, Saïfe, Houcine, Abdou, Salim.*

*Et aussi Dr Boussikïn. S qu'il a fait preuve d'une patience et a été un grand apport  
pour la réalisation de ce travail ses conseils ses orientation ainsi que son soutien moral  
et scientifique. Son encadrement était de plus exemplaire.*

*Et à toute la promotion de Toxicologie de xénobiotique et risque toxicologique en leur  
souhaitant une bonne continuation dans leurs travaux,*

*Et mon binôme Madiha.*

*Avec toute mon affection et ma reconnaissance*

**KARIM**

## Table des matières

ملخص

Abstract

Résumé

Remerciement

Dédicaces

Table des matières

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des symboles

Introduction

## Première partie : recherche bibliographique

<b>I. L'alloxane</b>	<b>02</b>
I.1. Définition	02
I.2. Historique	02
I.3. Mode d'action	03
<b>II. Stress oxydant</b>	<b>05</b>
II.1. Définition	05
II.2. Radical libre	05
II.3. Origine des espèces réactives	05
II.3.1. Origines endogènes	05
II.3.2. Exogène	06
II.4. Types des radicaux libres	07
II.4.1. Radicaux libres de l'oxygène (ERO)	07
II.4.1.1. L'anion superoxyde	07
II.4.1.2. Le radical hydroxyle	08
II.4.1.3. Radical peroxyde H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	09
II.4.1.4. Oxygène singulet	09
II.4.1.5. Rôle physiologique des espèces réactives oxydantes	09
II.4.2. Espèces réactives de l'azote (ERNs)	10
II.4.2.1. L'oxyde nitrique (•NO ; monoxyde d'azote)	10
II.4.2.2. Le peroxydinitrite (ONOO <sup>-</sup> )	10
II.4.2.3. Le dioxyde d'azote (NO <sub>2</sub> •)	11

II.5. Atteintes cellulaires	<b>11</b>
II.5.1. Peroxydation lipidique	<b>11</b>
II.5.2. Oxydation des protéines	<b>13</b>
II.5.3. Atteintes de l'ADN	<b>14</b>
II.6. Biomarqueurs du stress oxydant	<b>15</b>
II.6.1. Définition d'un biomarqueur	<b>15</b>
II.6.2. Différents types de biomarqueurs de l'oxydation cellulaire	<b>15</b>
II.6.2.1. Biomarqueurs de l'oxydation lipidique	<b>15</b>
a. Malondialdéhyde (MDA)	<b>15</b>
b. 4-hydroxynonéal (4-HNE)	<b>16</b>
c. Les isoprostanes (PG )	<b>16</b>
II.6.2.2. Biomarqueurs de l'oxydation des protéines	<b>16</b>
II.6.2.3. Biomarqueurs de l'oxydation des acides nucléiques	<b>17</b>
II.7. Défenses antioxydantes	<b>17</b>
II.7.1. Défenses antioxydantes enzymatiques	<b>18</b>
II.7.1.1. Superoxyde dismutases (SOD)	<b>18</b>
II.7.1.2. Catalase (CAT)	<b>19</b>
II.7.1.3. Glutathion peroxydase (GPx)	<b>20</b>
II.7.1.4. Glutathion réductase (GRase)	<b>21</b>
II.7.1.5. Glutathion S-transférase (GST)	<b>21</b>
II.7.1.6. Peroxyredoxine (Prx)	<b>21</b>
II.7.1.7. Glutaredoxine	<b>21</b>
II.7.1.8. Le système thiorédoxine (Trxred)	<b>22</b>
II.7.2. Défenses antioxydantes non enzymatiques	<b>23</b>
II.7.2.1. Glutathion	<b>23</b>
II.7.2.2. Le coenzyme Q et cytochrome c	<b>24</b>
II.7.2.3. Les métallothionéines	<b>24</b>
II.7.2.4. Acide lipoïque	<b>24</b>
II.7.2.5. La bilirubine	<b>24</b>
II.7.2.6. Acide urique	<b>24</b>
II.7.2.7. La vitamine C (acide L-ascorbique)	<b>24</b>
II.7.2.8. La vitamine E ( $\alpha$ - tocophérol)	<b>24</b>
II.7.2.9. La vitamine A (famille des caroténoïdes)	<b>25</b>

II.7.2.10. caroténoïdes	25
II.7.2.11. Oligo éléments	26
II.7.2.12. Les polyphénols	26
II.7.2.13. Thymus numidicus	26
II.7.2.13.1. Genre Thymus	27
A. Origine du nom	27
B. Distribution géographique	27
B.1. Dans le monde	27
B.2. En Algérie	27
C. Place dans la systématique	28
D. Description botanique	28
E. Potentiel antioxydant	29
E.1. Principes actifs du Thym	29
E.2. Travaux antérieurs	30

## Deuxième Partie : partie expérimentale

<b>A. Animaux</b>	<b>32</b>
<b>B. Protocole</b>	<b>33</b>
<b>1. Conditions d'élevage</b>	<b>33</b>
<b>2. Traitement des souris</b>	<b>33</b>
<b>3. Sacrifices et prélèvements d'organes</b>	<b>34</b>
3.1. Prélèvement sanguin	34
3.2. Prélèvement des organes	35
<b>C. Paramètres analysés et méthodes</b>	<b>37</b>
<b>1. Méthodes de dosage des paramètres biochimiques</b>	<b>37</b>
1.1. Transaminase glutamate oxaloacétate (TGO)	37
1.2. Glutamate pyruvate transaminases (TGP)	37
1.3. Phosphatase alcaline	38
1.4. Magnésium	38
<b>2. Méthodes de dosage des paramètres du stress oxydatif</b>	<b>39</b>
2.1. Préparation de l'homogénat	39
2.2. Dosage des protéines tissulaires	39
2.3. Dosage du glutathion	39
2.4. Glutathion peroxydase	40

---

2.5. Glutathion-S- transférase	41
2.6. Catalase	42
2.7. Malondialdéhyde (MDA)	43
<b>D. Etude statistique</b>	<b>45</b>
<b>Résultats</b>	<b>46</b>
A. Etude du poids corporel et poids relatif du foie	46
B. Etude des paramètres biochimiques sanguins	49
C. Etude des paramètres biochimiques tissulaires	53
<b>DISCUSSION</b>	<b>59</b>
A. Effet du <i>thymus numidicus</i> sur le poids corporel et le poids relatif du foie	59
B. Effet du <i>thymus numidicus</i> sur les paramètres biochimiques sanguins	60
C. Effet du <i>thymus numidicus</i> sur les paramètres biochimiques tissulaires	61
<b>Conclusion &amp; Perspectives</b>	<b>63</b>
<b>Références Bibliographiques</b>	<b>64</b>
<b>Annexes</b>	<b>75</b>

## Liste des tableaux

<b>Tableau N°</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
<b>Tableau 01</b>	Propriétés chimiques d'alloxane	<b>03</b>
<b>Tableau 02</b>	Localisation des principales espèces de genre <i>Thymus</i> en Algérie	<b>28</b>
<b>Tableau 03</b>	classification de <i>Thymus numidicus</i>	<b>28</b>
<b>Tableau 04</b>	Les flavonoïdes isolés de <i>Thymus numidicus</i> Poiret	<b>31</b>
<b>Tableau 05</b>	Classification des souris	<b>32</b>
<b>Tableau 06</b>	Variation du poids corporel et poids relatif du foie (g/100g de poids corporel) chez les souris témoins et traités après 21 jours de traitement.	<b>46</b>
<b>Tableau 07</b>	variation de l'activité enzymatique des transaminases et de la phosphatase alcaline sérique chez les lots témoin et les lots traités après 21 jours de traitement.	<b>49</b>
<b>Tableau 08</b>	variation de la magnésémie chez les lots témoin et les lots traités après 21 jours de traitement.	<b>52</b>
<b>Tableau 09</b>	Variation de la teneur hépatique en glutathion (GSH), Malon di aldéhyde (MDA), l'activité enzymatique de la glutathion peroxydase (GPx), glutathion -S- transférase (GST), catalase (CAT), chez les souris témoins et traités après 21 jours de traitement	<b>53</b>

## Liste des figures

Figure N°	Titre	Page
Figure 01	Formules chimiques de l'Alloxane, l'acide dialurique et butyl-alloxane	02
Figure 02	Réactions redox cyclables entre l'acide dialurique et l'alloxane	04
Figure 03	Source endogènes des espèces réactives	06
Figure 04	Intermédiaires réduits de l'oxygène. Les quatre étapes de réduction mono électronique de l'oxygène.	07
Figure 05	Production d'anion superoxyde dans la chaîne respiratoire	08
Figure 06	Synthèse mitochondriale du NO	10
Figure 07	Cibles biologiques et endommagement oxydatifs induits par les ERO	11
Figure 08	Réactions de la peroxydation lipidique	12
Figure 09	Nature de quelques modifications des chaînes latérales, d'acides aminés des protéines après attaque radicalaire	13
Figure 10	Types de lésions de l'ADN provoqués par les attaques radicalaires	14
Figure 11	Structure chimique du MDA	15
Figure 12	Structure chimique du 4-HNE	16
Figure 13	Distribution des antioxydants dans la cellule	18
Figure 14	Les trois types de la SOD	19
Figure 15	Interaction entre les sélénoenzymes et autres enzymes antioxydantes	20
Figure 16	Interaction entre les systèmes des thioredoxines, des glutaredoxines et du glutathion	22
Figure 17	insertion de la vitamine E au sein de la membrane lipidique.	25
Figure 18	Espèce <i>Thymus numidicus</i> Poiret (Nickavar <i>et al.</i> , 2005).	29
Figure 19	structure de flavonoïde de type flavone	30
Figure 20	Souris blanches mâles.	32
Figure 21	Conditions d'élevage des Souris.	33
Figure 22	Le sacrifice des souris.	34
Figure 23	Prélèvement du foie.	35
Figure 24	Schéma récapitulatif de protocole expérimental	36
Figure 25	Réaction du dialdéhyde malonique avec l'acide thiobarbiturique.	44
Figure 26	Etude de l'évolution du poids corporel(A) et gain du poids corporel (GP)	47

	chez le lot témoin et les lots traités pendant 21 jours de traitement.	
<b>Figure 27</b>	Evolution du poids relatif du foie (g/100g PC) chez le lot témoin et les lots traités pendant 21 jours de traitement.	<b>48</b>
<b>Figure 28</b>	variation de l'activité enzymatique des transaminases sériques chez les souris témoins et traités après 21 jours de traitement	<b>50</b>
<b>Figure 29</b>	variation de l'activité enzymatique de la phosphatase alcaline sérique chez les souris témoins et traités après 21 jours.	<b>51</b>
<b>Figure 30</b>	Variation du taux de magnésium sérique chez les souris témoins et traités après 21 jours.	<b>52</b>
<b>Figure 31</b>	Variation de la teneur hépatique en glutathion réduit (nmol/mg de protéine) chez les souris témoins et traités après 21 jours.	<b>54</b>
<b>Figure 32</b>	Variation de l'activité enzymatique de la glutathion peroxydase dans le foie chez les souris témoins et traités après 21 jours.	<b>55</b>
<b>Figure 33</b>	variation de l'activité enzymatique de la glutathion -S- transférase (nmol/mg de protéines) chez les souris témoins et traités après 21 jours.	<b>56</b>
<b>Figure 34</b>	Variation de l'activité du catalase ( $\mu\text{mol} / \text{min} / \text{mg} \text{ prot}$ ) dans le foie chez les souris témoins et traités après 21 jours de traitement.	<b>57</b>
<b>Figure 35</b>	Variation du malondialdéhyde (nmol/mg de prot) dans le foie chez les souris témoins et traités après 21 jours de traitement	<b>58</b>

**Liste des symboles**

**μ mol** : Micromoles

**OH** : Radical hydroxyle

**1O<sub>2</sub>** : Oxygène singulet.

**4-HNE** : 4-hydroxy-2-nonéanal.

**5-OH-Cyt** : 5-hydroxycytosine

**ADN** : Acide désoxyribonucléique

**AG** : Acide gras

**AGPI** : Acides gras polyinsaturés

**ALT** : Alanine aminotransférase

**AST** : Aspartate aminotransférase

**ATP** : Adénosine triphosphate

**BBC** : Bleu de coomassie

**BSA** : Sérum albumine bovine

**Ca<sup>2+</sup>** : Ion calcium

**CAT** : Catalase.

**CDNB** : 1-chloro, 2,4-dinitrobenzène

**CO<sub>2</sub>** : Dioxyde de carbone

**CoQ10** : Ubiquinone

**COX** : Cyclo-oxygénases

**Cu** : Cuivre.

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

**Cu<sup>2+</sup>** : Ion cuivre

**DU** : Dose unique

**DO** : Densité optique

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

**Ec-SOD** : Superoxyde dismutase extracellulaire

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

**ERN** : Espèces Réactives de l'azote

**ERO** : Espèces Réactives de l'Oxygène.

**Fe** : Fer

**GIGPx** : Isoforme spécifique des cellules digestives

**GLUT<sub>2</sub>** : Glucokinase 2

**GPx** : Glutathion peroxydase

**GRase** : Glutathion réductase  
**Grx**: Glutarédoxine  
**GSH**: Glutathion réduit  
**GSSG**: Glutathion oxydée  
**GST**: Glutathion –S- transférase  
**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** : Peroxyde d'hydrogène.  
**HCL** : Chlorure d'hydrogène  
**HNO** : Nitroxyle  
**HO<sup>o</sup><sub>2</sub>** : Radical hydroperoxyde  
**HOCl** : Hypochloreux  
**LDH** : Lactate déshydrogénase  
**LDL** : Low density lipoproteins (lipoprotéines de basse densité)  
**LOXs** : Lipoxygénases  
**LPO** : Lipides Peroxydés  
**MDA** : Malondialdéhyde  
**MDH** : Malate déshydrogénase  
**Mg<sup>+2</sup>** : Ion magnésium  
**Mn** : Manganèse  
**Mn-SOD** : Superoxyde dismutase associée au manganèse.  
**NADPH** : Nicotinamide-adéninedinucléotide- phosphate réduit.  
**NO** : Monoxyde d'azote  
**NO<sub>2</sub>•** : dioxyde d'azote  
**NO<sub>s</sub>NO**: Synthase  
**O<sub>2</sub>**: Oxygène  
**O<sub>2</sub>•-**: Radical superoxyde (anion superoxyde).  
**ONOO** : Péroxynitrite  
**PAL**: Phosphatase alcaline  
**PG** : Prostaglandines  
**Prx**: Péroxy rédoxine  
**R•** : Radical carboné  
**RO<sub>2</sub>•** : Radical peroxyde  
**ROHA**: Lcools  
**ROOH**: Hydroperoxydes

**Se:** Sélénium

**SH:** Groupement thiol

**SOD:** Superoxyde dismutase.

**SSA :** Acide sulfosalicylique

**STZ :** Streptozotocine

**T :** Témoin sain

**TBA :** Thiobarbituric acid: L'acide thiobarbiturique

**TCA :** Trichloroacétique.

**TGO :** Transaminase glutamate oxaloacétate

**TGP :** Glutamate pyruvate transaminases

**TN :** *Thymus numidicus*

**TP :** Tampon phosphate

**Trx :** Thioredoxine

**Trx<sub>red</sub> :** Trx réductase

**U :** Unité enzymatique.

**Zn :** Zinc

**$\alpha$ -Toch :** Alpha tocophérol

# **Introduction**

### Introduction

L'Alloxane est une molécule chimique peut générer des EROs et entrainer l'organisme dans un état du stress oxydatif (**Grankvist et al., 1981**), il est utilisé comme un modèle expérimental donc c'est une bonne stratégie pour mieux comprendre les physiopathologies liée au stress oxydant pour développée un drogue curative, il faut noter que l'alloxane provoque un diabète de type 1, dans le laboratoire il est utilisé sur plusieurs espèces animale comme les rats, chiens, lapins. Il est maintenant prouvé que le diabète est étroitement lié au stress oxydant, et plusieurs études ont montré qu'il est associé à une augmentation de la production des radicaux libres, ces dernier sont produit à faible quantité en permanence porte un effet physiologique dans notre vie quotidienne, ils ont bien maitrisé par un système de défense.

En effet, les concentrations élevées en ERO induisent un stress oxydant, qui est due à un déséquilibre entre le système antioxydant et la molécule oxydante, celle-ci est considérée comme le moteur qui génère d'autre complication comme les maladies cardiovasculaires et les cancers. Et pour renforcer et améliorer la performance de système de défense antioxydant on utilise des plantes porte un grand intérêt comme source énorme d'antioxydants comme *Thymus numidicus* et les études révèlent leur pouvoir antioxydant élevé, ce qui donne plus d'espoir pour prévenir et ou guérir les maladies lie au stress oxydant (**Bonnefont-Rousselot, 2010**).

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 hépatique induite par ce dernier.

Nous allons pour cela mis au point le dosage des paramètres biochimiques sanguins « bilan hépatique » ainsi que l'évaluation des paramètres du stress oxydant tissulaires « GSH, GPx, CAT, GST », et un produit de la peroxydation lipidique «MDA».

Afin de comprendre le but de cette étude, la 1re partie de ce travail est consacrée au:

L'alloxane et leur effet et le stress oxydant, le système anti oxydant enzymatique et non enzymatique et finalement le *Thymus numidicus* entant qu'anti oxydant.

La seconde partie s'intéresse au protocole mis en place et aux résultats obtenus.

**Première partie**  
**Recherche bibliographique**

## I. L'alloxane

### I.1. Définition

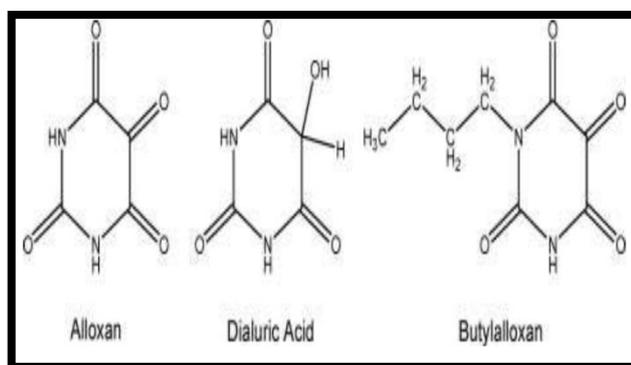
L'alloxane est un composé organique basé sur un squelette de l'hétérocyclique de la pyrimidine (**Grankvist et al., 1981**). C'est le produit chimique le plus couramment utilisé pour l'induction du diabète expérimental. C'est un agent bien connu largement utilisé pour induire un diabète de type 1 chez les animaux tels que : les lapins, les rats, les souris et les chiens (**Etuk, 2010**).

C'est un dérivé de l'urée qui provoque sélectivement une nécrose pancréatique des cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans (**Etuk, 2010**).

### I.2. Historique

En 1818, le Brugnatelli italien a obtenu une substance à partir de l'oxydation de l'acide urique qu'il a 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 (**Lenzen et al., 1996**).

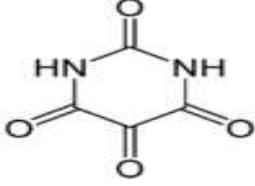
Vingt ans plus tard, les chimistes allemands, Wöhler et Liebig, ont étudié l'oxydation de l'acide urique dans le détail et ont obtenu le même composé, qu'ils ont appelé alloxane. Le nom alloxane issu de la fusion de deux mots, à savoir, allantoïne et acide oxalorique. L'allantoïne est un produit de l'acide urique excrété par le fœtus dans l'allantoïde et l'acide oxalorique est dérivé de l'acide oxalique et l'urée qui se trouve dans l'urine (voir figure 1) (**Lenzen et al., 1996**).



**Figure 1:** Formules chimiques de l'Alloxane, l'acide dialurique et butyl-alloxane (**Grankvist et al., 1981**).

L'alloxane resté uniquement dans le domaine de la pharmacie jusqu'en 1943, lorsque Dunn *et al.*, ont signalé que cette substance provoque une nécrose des îlots pancréatiques lorsqu'il est administré à des lapins ou des rats (**Lenzen *et al.*, 1996**). L'alloxane est sélectivement toxique pour les cellules  $\beta$  du pancréas, ce qui provoque le diabète chez les animaux de laboratoire. Cette substance est alors devenue d'un grand intérêt pour les diabétologues, devenant un outil standard pour l'induction du diabète chez les animaux (**Lenzen *et al.*, 1996**).

**Tableau 1:** Propriétés chimiques d'alloxane (**Hashemi, 2009**).

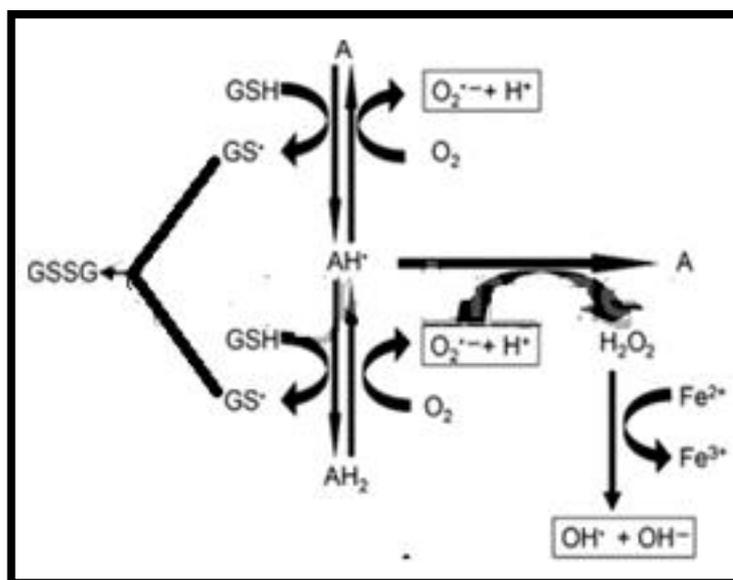
<p><b>La formule chimique:</b></p>	
<p><b>Nom chimique:</b></p>	<p>2, 4, 5,6(1H, 3H)-pyrimidine tétraone monohydrate.</p>
<p><b>Structure chimique:</b></p>	<p>C<sub>4</sub>H<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub></p>
<p><b>Masse moléculaire:</b></p>	<p>160,09 g/mol.</p>
<p><b>Point de fusion:</b></p>	<p>253°C.</p>

### I.3. Mode d'action

L'alloxane, par une analogie structurale au glucose, pénètre à travers les transporteurs de glucose GLUT2 des cellules  $\beta$  pancréatiques. Au cytosol, l'Alloxane est réduit en acide dialurique. Cette réduction est assurée par plusieurs agents tels que le glutathion réduit, la cystéine, l'acide ascorbique et les groupements SH des protéines (**Lenzen, 1988**).

L'alloxane a un groupe 5 carbonyles centraux qui réagissent 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 (**Lenzen, 2008**). L'alloxane se relie avec deux groupements thiol du site actif de la glucokinase formant un pont disulfure et inactivant l'enzyme (**Lenzen *et al.*, 1988**).

L'inhibition de la glucokinase, réduit l'oxydation du glucose et la génération de l'ATP, ce qui supprime le signal d'ATP, qui déclenche la sécrétion d'insuline. L'inhibition de la glucokinase est atteinte en 1 min d'exposition à l'alloxane. Cet effet peut être expliqué par une réduction initiale de la consommation d'ATP, résultante d'un blocus de la phosphorylation du glucose par la glucokinase, ce qui produit une augmentation transitoire de l'ATP dans la cellule  $\beta$  et déclenche une libération transitoire de l'insuline (Lenzen, 2008). L'acide dialurique formé est ré-oxydé en alloxane, ce qui génère des espèces réactives oxygénées et active à la réaction de Fenton (Ankur et Shahjad, 2012). L'alloxane inhibe la sécrétion de l'insuline glucose-dépendante et augmente la perméabilité des membranes des cellules  $\beta$  (voir figure 2) (Watkins *et al.*, 1964).



**Figure 2:** Réactions redox cyclables entre l'acide dialurique et l'alloxane (Lenzen, 2008).

En outre, la perturbation de l'homéostasie de calcium intracellulaire, également été signalé à constituer une étape importante dans l'action diabétogènes de l'alloxane. Il a été noté que l'alloxane cytosolique libre augmente la concentration du Ca<sup>2+</sup> dans les cellules  $\beta$  pancréatique. L'afflux de calcium est entraîné la capacité de l'alloxane de dépolariser les cellules  $\beta$  du pancréas, qui s'ouvre en outre tension les canaux calciques voltage-dépendants et améliore l'entrée du calcium dans des cellules pancréatiques. La concentration accrue d'ion Ca<sup>2+</sup> contribue davantage à supra-physiologique la libération d'insuline qui avec ERO a été noté finalement causer des dommages des cellules  $\beta$  des îlots pancréatiques (Ankur et Shahjad, 2012).

L'alloxane exerce son action diabétogène quand il est administré par voie parentérale: intraveineuse, intra péritonéale ou sous-cutanée. La dose requise de l'alloxane pour induire un diabète dépend de l'espèce animale. Les îlots de l'espèce humaine sont nettement plus résistants à

l'alloxane que ceux du rat et de la souris. La dose intra-péritonéale inférieure à 50 mg / kg en poids brut peut être insuffisante pour induire un diabète chez le rat. Animaux à jeun sont plus sensibles à l'alloxane, alors que l'augmentation du glucose dans le sang fournit une protection partielle (Szkudelski, 2001).

## II. Stress oxydant

### II.1. Définition

Le stress oxydant c'est un état de déséquilibre entre la production des espèces réactives et leurs éliminations par le système de défense antioxydant. ces espèces réactives sont des radicaux libres (Sies, 1991).

### II.2. Radical libre

Les radicaux libres sont des espèces chimiques (atomes ou molécules) possédant un électron non apparié à sa orbite extérieur ce qu'il rend instable, et se stabiliser en se fixant sur des molécules biologiques, il existe 2 grands familles d'espèces réactives (Sies, 1991):

- **ERO:** sont produits au début à la réduction ou l'oxydation de l'oxygène singlet  $1O_2$  en anion superoxyde  $O_2^{\cdot-}$  celle-ci va déclencher une cascade de réactions qui donne naissances aux multiples dérivés de l'oxygène actif.
- **ERN:** issu de l'activité d'enzyme NO synthase qui libère le mono-oxyde d'azote  $NO^{\cdot}$  et ce dernier va donner plusieurs dérivés d'ERN.

### II.3. Origine des espèces réactives

#### II.3.1. Origines endogènes

La principale source des radicaux  $O_2^{\cdot}$  et  $H_2O_2$ , pendant le métabolisme énergétique cellulaire, est la chaîne respiratoire (Daverman *et al.*, 2002). Les mitochondries ont été identifiées comme responsables de l'initiation de la plupart des réactions des radicaux libres se produisant dans les cellules (Fusco, 2007), l'oxygène est réduit à 95 % dans les mitochondries (centrale énergétique de la cellule) par voie enzymatique en molécule non toxique comme  $H_2O$  (Belkheiri, 2010).

Les NAD (P) H oxydases sont des enzymes présentes dans la paroi vasculaire et qui génèrent  $O_2^{\cdot}$  en utilisant NADH ou NADPH comme substrat.

Il y a également d'autres sources cellulaires des radicaux libres telles que l'enzyme xanthine oxydase joue un rôle important dans la production des ERO (particulièrement  $O_2^{\cdot}$  et  $H_2O_2$ ) (Belkheiri, 2010).

Lors du métabolisme de l'acide arachidonique, ce dernier peut être oxydé soit par les cyclo-oxygénases ou COX, soit par les lipo-oxygénases (métallo-enzymes à fer), pour former entre autre des hydroperoxydes. La production d'oxydant par les neutrophiles et les macrophages (au

cours de l'inflammation) est également une source importante qui dépend de l'activité enzymatique de la NADPH-oxydase, d'autres sources dépendent d'enzymes les oxydases membranaires, les synthétases de l'oxyde nitrique, qui produisent physiologiquement des oxydants. La présence de pro-oxydants peut transformer les oxydants en des formes plus réactives par exemple: le fer qui favorise la transformation du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) en radical hydroxyle ( $HO\bullet$ ) (Rahman, 2007).

Les ERO peuvent aussi être produits par la NO Synthase (ou  $NO_S$ ), à des fins de médiation par les neurones, les cellules endothéliales ou les macrophages. De manière générale, toute réaction biochimique faisant intervenir de l'oxygène moléculaire est susceptible d'être à l'origine d'une production des radicaux libres oxygénés (voir figure 3) (Mao et Paznausky, 1992).

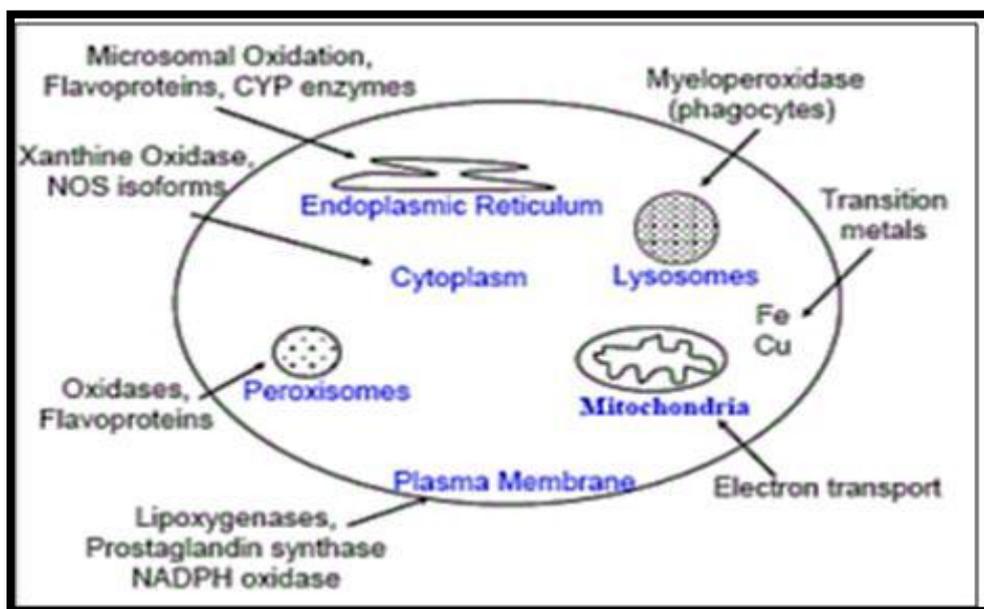


Figure 3 : Source endogènes des espèces réactives (Belkheiri, 2010).

### II.3.2. Exogène

Les facteurs environnementaux contribuent également à la formation d'entités radicalaires ou de ERO, ou dans les phénomènes d'irradiation UV, X, gamma, réaction photochimique (Belkheiri, 2010).

Les métaux toxiques (chrome, vanadium), mais aussi le cuivre et le fer libre existant lors de surcharges générales ou localisées génèrent des radicaux hydroxyles (Favier., 2003).

Les champs électriques, l'apport de xénobiotiques pro-oxydants et la présence de cytokines pro-inflammatoires sont également des sources de stress oxydant.

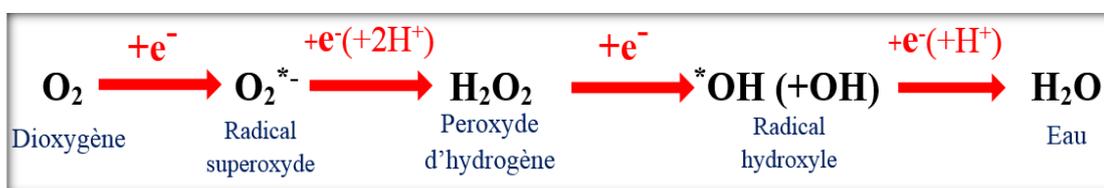
En outre, des résidus de la fumée de cigarette, l'alcool ou même certains médicaments sont une source importante des radicaux libres par oxydation des composés au niveau du cytochrome P<sub>450</sub> (Hatch., 2010).

## II.4. Types des radicaux libres

### II.4.1. Radicaux libres de l'oxygène (ERO)

Les Espèces Réactives Oxygénées (ERO) sont des molécules contenant de l'oxygène, mais dont la réactivité est bien supérieure à celle de la molécule de dioxygène (Morel & Barouki, 1999).

L'oxygène peut subir des étapes successives de réduction conduisant à la formation d'ERO (voir figure 4). En présence de métaux, de molécules organiques ou d'enzymes (oxydases ou complexes de la chaîne respiratoire) (Barouki, 2006).



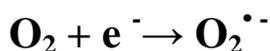
**Figure 4:** Intermédiaires réduits de l'oxygène. Les quatre étapes de réduction monoélectronique de l'oxygène (Gardès-albert *et al*, 2003).

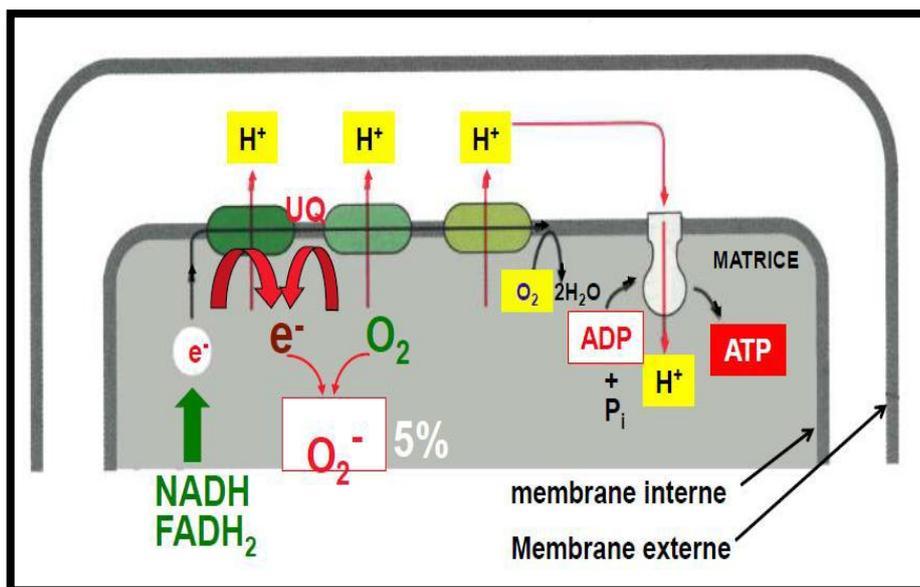
#### II.4.1.1. L'anion superoxyde

Les radicaux superoxydes  $\text{O}_2^{\bullet-}$  sont des radicaux chargés négativement provenant de la réduction monovalente de l'oxygène moléculaire qui capte un électron. (Halliwell et Gutteridge, 1986).

Qui sont peu réactifs par eux-mêmes mais il est à l'origine de cascades de réactions conduisant à la production de molécules très nocives sa durée de vie est plus longue et il peut diffuser loin de son lieu de production (Pastre, 2005).

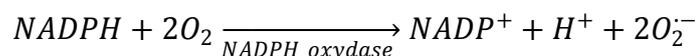
Il est produit au cours du métabolisme mitochondrial physiologique, environ 2% de l'oxygène utilisé par la chaîne respiratoire aboutit à la formation d'anion superoxyde à la suite de la réaction suivante (voir figure 5):





**Figure 5:** Production d'anion superoxyde dans la chaîne respiratoire mitochondriale (Alberts *et al.*, 2009).

La NADPH oxydase se trouve dans la membrane plasmique ainsi que dans la membrane du phagosome et elle est également une source importante d'anion superoxyde (Pastre, 2005).



Ils peuvent aussi sous l'action du superoxyde d'hydrogène  $H_2O_2$  qui en présence d'ions métalliques donne des radicaux hydroxyles  $OH^{\cdot}$  très réactif. La forme protonée du radical  $O_2^{\cdot -}$ , le radical hydroperoxyde  $HO_2^{\cdot}$ , est beaucoup plus réactive qu' $O_2^{\cdot -}$ . La réactivité d' $OH_2^{\cdot}$  non chargé contrairement à  $O_2^{\cdot -}$  sera facilitée au niveau des membranes biologiques (Delattre *et al.*, 2003).

#### II.4.1.2. Le radical hydroxyle

Le radical hydroxyle est un des oxydants les plus réactifs et le plus dangereux du système biologique (Sayre *et al.*, 2008). Il peut réagir avec de nombreuses molécules comme l'ADN spécifiquement la thiamine et la guanosine (Pastre, 2005).

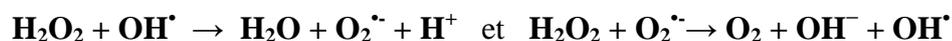
Il est très réactif vis-à-vis des structures organiques est le radical le plus dangereux dans l'organisme et joue un rôle initiateur dans l'auto-oxydation lipidique (Sayre *et al.*, 2008).

Il peut être produit à la suite de diverses réactions (Pastre, 2005) :

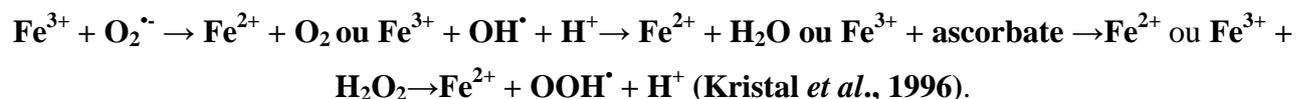
- La réaction de Fenton:



- La réaction d'Haber-Weiss en deux étapes:



La continuité des réactions se ferait grâce à la régénération du fer ferreux par divers composés:



#### II.4.1.3. Radical peroxyde $\text{H}_2\text{O}_2$

Au niveau de la mitochondrie, le peroxysome, et les microsomes sous l'action catalytique du superoxyde dismutase (SOD), le radical superoxyde  $\text{O}_2^{\cdot-}$  est réduit en peroxyde d'hydrogène.



Le peroxyde d'hydrogène  $\text{H}_2\text{O}_2$  n'est pas une espèce radicalaire, est un oxydant très puissant moins réactif que certains autres EROs, il n'est pas chargé et peut donc diffuser très facilement à travers les membranes. Joue un rôle important dans le stress oxydant. Qui provoque des dommages causés par oxydation aux macromolécules (Stief, 2000).

Le peroxyde d'hydrogène à faible concentration active la signalisation et pourrait être impliqué dans des réponses physiologiques comme le cycle de Krebs, la croissance, la régulation du calcium (Stief, 2000).

#### II.4.1.4.. Oxygène singulet

Lorsque de l'énergie est apportée à l'oxygène, celui-ci passe à l'état singulet qui représente la forme active. (Borg et Tjalve, 1988) C'est une forme très énergétique de grande réactivité qui peut réagir avec les macromolécules biologiques (ADN, Protéines, lipoprotéines...).

Il est formé à partir de l'ion superoxyde selon la réaction suivante :



#### II.4.1.5. Rôle physiologique des espèces réactives oxydantes

De façon physiologique, les ERO existent dans les cellules et dans les tissus à des concentrations faibles mais mesurables Elles protègent, régulent la cellule et permettent de maintenir une certaine homéostasie de l'état redox de l'organisme. Et contribuent à la synthèse de l'ADN, des hormones stéroïdes, des acides biliaires, des acides gras insaturés, aux réactions dépendantes de la vitamine B12, à la biosynthèse des mitochondries, Ils sont les médiateurs de multiples fonctions de signalisation (signaux redox) et de transcription essentielles pour le fonctionnement normal et la survie des cellules, ainsi que de la programmation de leur élimination. Les radicaux libres jouent un rôle essentiel dans le bon déroulement de la réaction immunitaire (Migdale et Serres, 2011).

Elles servent dans la régulation de phénomène de l'apoptose. Citons aussi le processus de fécondation, au cours duquel les spermatozoïdes sécrètent de grandes quantités d'ERO pour percer la paroi membranaire de l'ovule. (Migdale et Serres, 2011).

## II.4.2. Espèces réactives de l'azote (ERNs)

### II.4.2.1. L'oxyde nitrique ( $\bullet\text{NO}$ ; monoxyde d'azote)

Il diffuse rapidement à partir de son site de production, traverse la membrane cellulaire et remplit un rôle vasodilatateur. Il est un second messenger de courte vie (Cooke *et al.*, 2006), réagit très rapidement avec  $\text{O}_2^{\bullet-}$  pour former  $\text{ONOO}^-$  et avec  $\text{O}_2$  pour former  $\text{N}_2\text{O}_4$ . C'est un oxydant faible, incapable de nitration, mais un bon agent de nitrosation s'il a un cofacteur approprié pour recevoir un électron. Fixé au  $\text{Fe}^{3+}$  des molécules hémiques, il peut nitrosé des phénols, des thiols et des acides aminés (Moncada, 1993) (voir figure 6).

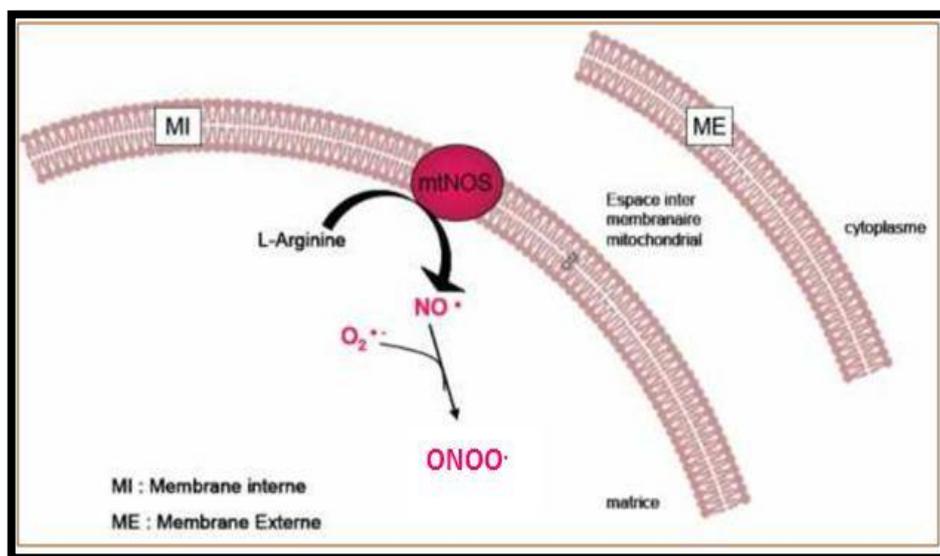


Figure 6: Synthèse mitochondriale du NO (Ghafourifar & Cadenas, 2005).

### II.4.2.2. Le peroxydinitrite ( $\text{ONOO}^-$ )

$\text{ONOO}^-$  est non radicalaire, instable (durée de vie < une seconde) et très oxydant (Ghafourifar & Cadenas, 2005).

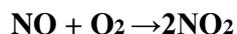
La réaction du NO avec anion superoxyde donne naissance au peroxydinitrite



Le Peroxydinitrite est un dérivés d'oxygène très toxique provoque des lésions tissulaires très graves en plus de l'oxydation des LDL (Halliwell et Gutteridge, 1997). Et capable d'oxyder les protéines et les bases azotiques des brins d'ADN par une grande similarité de l'oxydation par le radical hydroxyle (Moncada, 1993).

### II.4.2.3. Le dioxyde d'azote (NO<sub>2</sub>•)

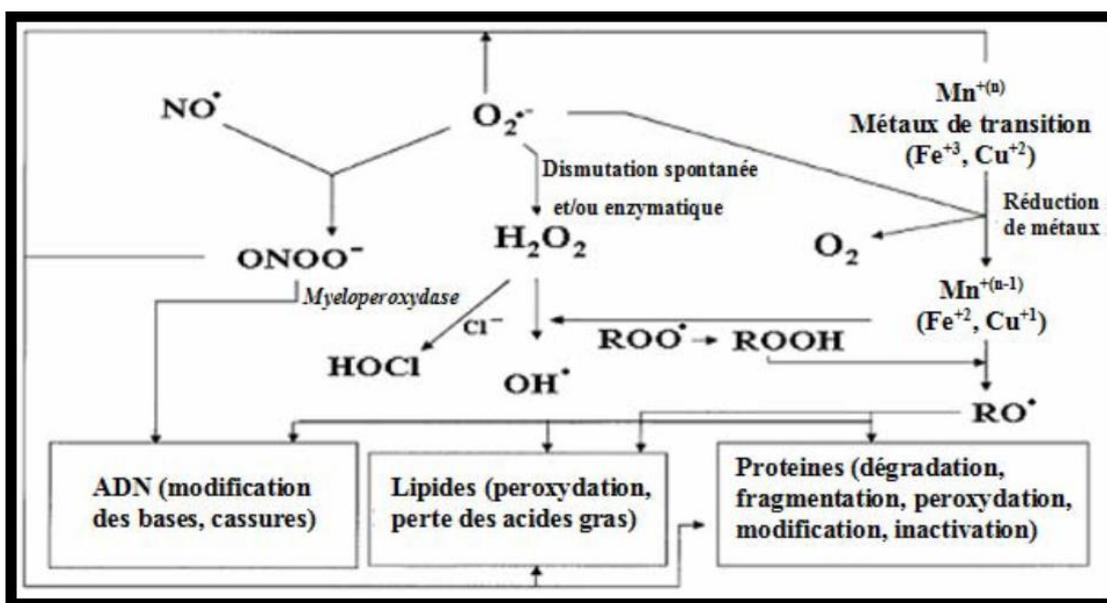
Formé à partir de la réaction du radical peroxyde avec NO



Le dioxyde d'azote est un puissant déclencheur de la peroxydation lipidique par sa capacité d'arracher un atome d'hydrogène d'une double liaison au niveau des acides gras polyinsaturés (**Blandine, 2006**) (Acide linoléique 18:2 ω 6 ; α-linolénique 18:3 ω 3 et γ-linolénique 18:3 ω 6 ; acide arachidonique 20:4 ω 6) et transforme ces acides soit de cis-en trans, soit par nitration (**Blandine, 2006**).

### II.5. Atteintes cellulaires

Le stress oxydatif traduit par des dommages oxydatifs de l'ensemble des constituants cellulaires : les lipides avec perturbations des membranes cellulaires, les protéines avec l'altération des récepteurs et des enzymes, les acides nucléiques avec un risque de mutation et de cancérisation (**Blandine, 2006**) (voir figure 7).



**Figure 7:** Cibles biologiques et endommagement oxydatif induits par les ERO (**Blandine, 2006**).

#### II.5.1. Peroxydation lipidique

Le stress oxydant concerne tous les constituants cellulaires mais Les premières cibles privilégiées de l'attaque radicalaire sont les lipides (**Halliwell et Gutteridge, 1997**) et principalement leurs acides gras polyinsaturés (AGPI) comme les lipides majeurs des membranes cellulaires et des lipoprotéines (**Esterbauer et al, 1992**).

En raison de la présence de nombreuses doubles liaisons comme l'acide linoléique (C18:2), linoléique (C18:3), arachidonique (C20:4).

Ce phénomène de peroxydation lipidique peut se produire dans des conditions physiologiques et il se trouve exacerbé dans des conditions pathologiques comme l'athérosclérose. La peroxydation lipidique, se déroule en trois phases suivantes (voir figure 8):

**a. L'initiation:** l'attaque par un radical  $\text{OH}^\bullet$  du groupement méthylène présent entre deux doubles liaisons d'acide gras polyinsaturés produit un radical carboné  $\text{R}^\bullet$  ( $\text{OH}^\bullet$  enlève un atome d'hydrogène du  $\text{CH}_2$  puis les doubles liaisons subissent un réarrangement moléculaire conduisant à la formation de diènes conjugués), en présence de  $\text{O}_2$  le radical carboné est transformé en radical peroxyde  $\text{RO}_2^\bullet$  (Matrizez-Cayuela, 1995).

**b. La propagation:** le radical  $\text{RO}_2^\bullet$  enlève un hydrogène à un nouvel AGPI voisin qui à son tour produira un radical  $\text{R}^\bullet$  puis un radical  $\text{RO}_2^\bullet$  une réaction en chaîne s'installe. En présence de métaux de transitions ( $\text{Fe}^{2+}$  ou  $\text{Cu}^{2+}$ ), les hydroperoxydes formés peuvent subir un clivage au niveau des liaisons C-C pour donner naissance à divers produits de décompositions ; le malondialdéhyde (MDA), le 4-hydroxynonéal (4-HNE), représentant les produits les plus toxiques de la peroxydation lipidique (Matrizez-Cayuela, 1995).

**c. La terminaison:** cette phase consiste à former des composés stables issus de la rencontre entre deux espèces radicalaires ou le plus souvent par la réaction d'un radical avec une molécule antioxydante dite "briseur de chaîne" (Matrizez-Cayuela, 1995).

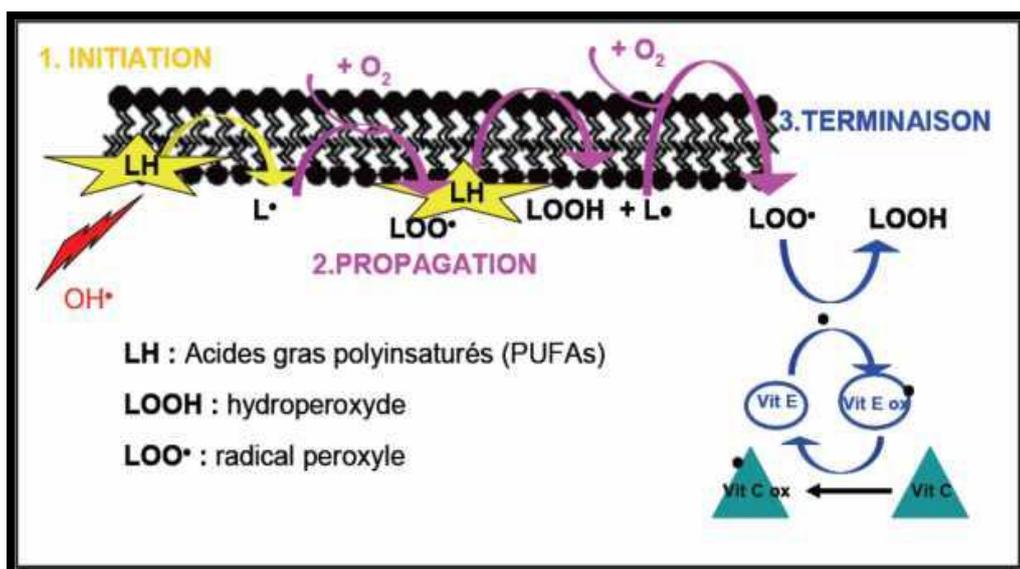


Figure 8: Réactions de la peroxydation lipidique (Deby-Dupont *et al.*, 2002).

La peroxydation des lipides induit une modification de la fluidité, de la perméabilité et de l'excitabilité des membranes.

Elle fournit également une grande variété de produits qui peuvent réagir avec les protéines et l'ADN. Parmi les produits formés lors de la peroxydation lipidique, l'isoprostane, le malondialdéhyde (MDA), le crotonaldéhyde et le 4-hydroxynonenal (4-HNE) sont étudiés comme marqueurs de la peroxydation lipidique (**Garait, 2006**).

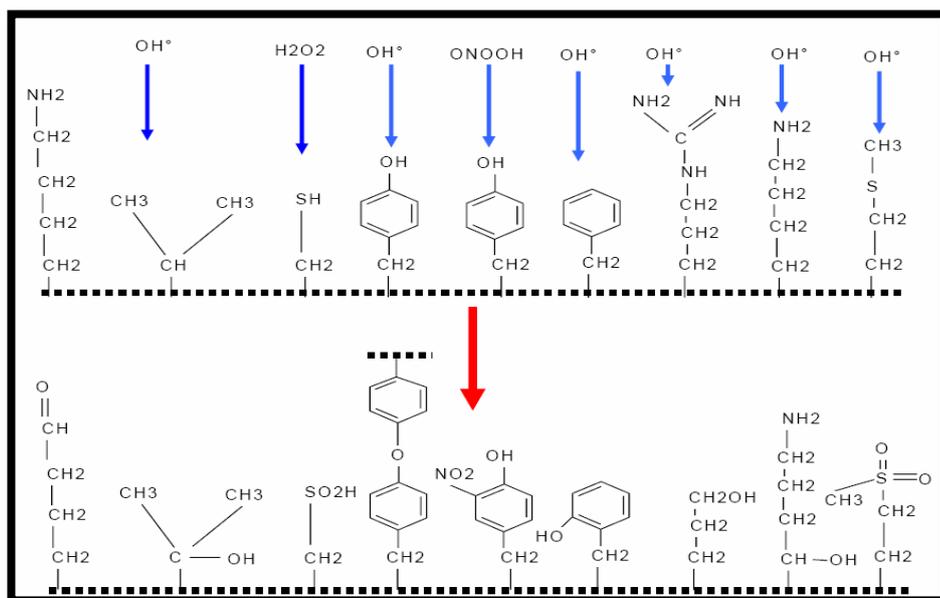
### II.5.2. Oxydation des protéines

Les protéines, au même titre que les lipides, sont également une cible importante des ERO. soit au niveau de leur chaîne latérale, avec formation de produits d'oxydations, soit au niveau de la liaison peptidique, entraînant la fragmentation de la chaîne (**Leibfrilz et al., 2007**).

Les protéines les plus sensibles aux attaques radicalaires sont surtout celles qui comportent un groupement sulfhydryle (SH) (**Favier, 1995**), notamment les acides aminés soufrés (cystéine et méthionine) et aromatiques (tyrosine, tryptophane) (**Valko et al., 2007**).

L'oxydation des acides aminés génère des groupements hydroxyles et carbonyles sur les protéines mais peut également induire des modifications structurales plus importantes comme des réticulations intra ou intermoléculaires, ce qui affecte leurs fonctionnements, antigénicités et leurs activités (voir figure 9) (**Leibfrilz et al., 2007**).

Les protéines modifiées par oxydation perdent leurs propriétés biologiques (enzyme, anti-enzyme, récepteur...) (**Levine et al., 2000**) et deviennent généralement plus sensibles à l'action des protéases et sont alors dirigées vers la dégradation protéolytique au niveau du protéasome .



**Figure 9:** Nature de quelques modifications des chaînes latérales, d'acides aminés des protéines après attaque radicalaire (**Esterbuaer, 1992**).

### II.5.3. Atteintes de l'ADN

Avec ses quelques 4. 10 Paires de bases, l'acide désoxyribonucléique ou ADN nucléaires et mitochondriales constituent une cible cellulaire importante (Cadet *et al.*, 2002). Les bases qui composent l'ADN sont hautement sensible aux ERO ( $\bullet\text{OH}$ ,  $\text{HNO}$ ,  $\text{ONOO}$ , dérivés d' $\text{HOCl}$ ) (Cadet *et al.*, 2002).

Les réactions d'oxydation de l'ADN créant un grand nombre de dommages et particulièrement la guanine, sont sensibles à l'oxydation. L'attaque radicalaire peut être directe et entraîner l'oxydation des bases, engendrant un grand nombre de bases modifiées : 8 oxo guanine, 8 nitroguanine, forme amidopyrimidine, 8 oxo adénine, formimidouracile, 5 hydroxy cytosine, 5 hydroxy méthyl uracile, thymine diol, oxazolone (voir figure 10) (Favier, 2003).

Mais le stress oxydant peut aussi attaquer la liaison entre la base et le désoxyribose, ou attaquer le sucre lui-même, créant une coupure de chaîne simple brin. Formation de pontages ADN-ADN et les pontages ADN-protéines ou avec des dérivés d'oxydation lipidique (des aldéhydes mutagènes tel que le MDA, formant des adduits sur les bases de l'ADN de type MDA-guanine).

Les altérations du matériel génétique s'accumuleront au sein de l'ADN représentant ainsi la première étape impliquée dans la mutagenèse, la carcinogenèse et le vieillissement (McCord & Fridovich, 1988).

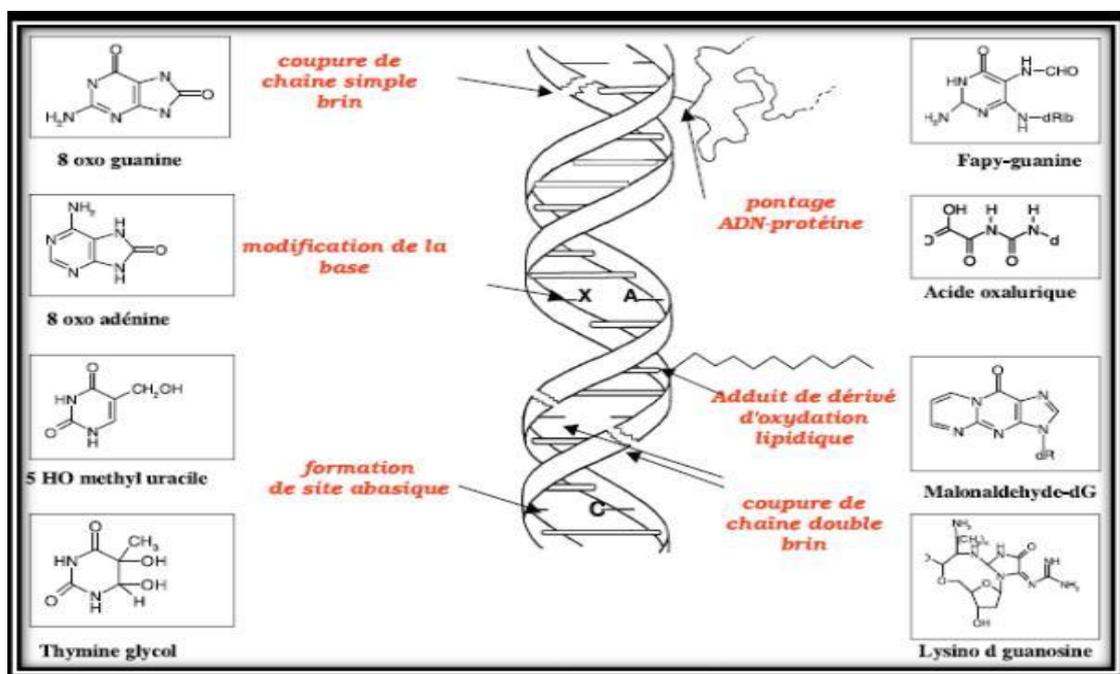


Figure 10: Types de lésions de l'ADN provoqués par les attaques radicalaires (Wallace *et al.*, 2008).

## II.6. Biomarqueurs du stress oxydant

### II.6.1. Définition d'un biomarqueur

Le terme de biomarqueur a été transposé de l'épidémiologie moléculaire par les biologistes des radicaux libres pour décrire un changement moléculaire dans une molécule biologique provenant d'une attaque des espèces réactives de l'oxygène, de l'azote et de composés halogénés. Il peut être défini comme toute molécule biologique de l'organisme susceptible de servir de marqueur d'un phénomène physiopathologique (**ex**: l'inflammation) (**Durieu et al., 2010**).

### II.6.2. Différents types de biomarqueurs de l'oxydation cellulaire

#### II.6.2.1. Biomarqueurs de l'oxydation lipidique

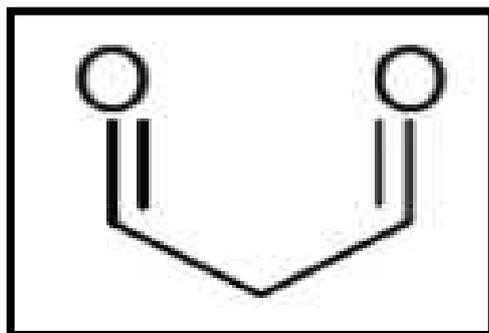
Les triglycérides dans les LDL (Low Density Lipoproteins) et les phospholipides des membranes sont fortement sensibles aux attaques des radicaux libres. Le processus de peroxydation lipidique est initié par la formation d'un radical peroxy et se termine finalement par la formation d'aldéhydes (**Zuliani et al., 2013**). Les deux principaux aldéhydes sont le malondialdéhyde (MDA) et le 4-hydroxynonanal (4-HNE) (**Kim et al., 2013**).

Durant ce processus de peroxydation, d'autres produits sont formés comme le pentane et l'éthane, les 2-3 diènes conjugués, et les cholestéroxydes (**Griffiths et al., 2002**).

**a. Malondialdéhyde (MDA):** Le MDA fait partie des aldéhydes réactifs issus de la décomposition des LPO. En raison de son caractère mutagène et athérogène, il est le produit le plus étudié de la dégradation des LPO (**Douki et al., 1996**).

Il a été proposé comme biomarqueur du stress oxydant dans l'urine des rats traités avec des agents toxiques pour le foie. Il est sans doute le plus mutagène des produits de la peroxydation lipidique. C'est pourquoi il est considéré comme ayant une implication dans l'initiation des cancers (**Cadet et al., 1998**).

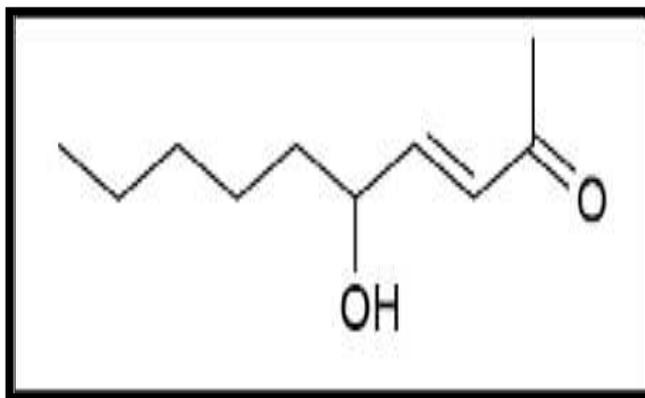
Sa structure chimique est représentée dans la figure 11.



**Figure 11:** Structure chimique du MDA (**Dalle-Donne et al., 2006**).

Les principales origines du MDA dans les échantillons biologiques proviennent de la peroxydation des acides gras polyinsaturés avec au moins 3 doubles liaisons C=C adjacentes comme par exemple dans l'acide arachidonique (20:4) ou l'acide docosahexaénoïque (22:6)(Helbock *et al.*, 1998).

**b. 4-hydroxynonéal (4-HNE):** le 4-HNE est le produit de la peroxydation lipidique le plus génotoxique (Ravanat, 1998). Dans l'organisme, il se forme en quantités plus importantes que le MDA. Sa structure chimique est représentée dans la Figure 12.



**Figure 12:** Structure chimique du 4-HNE (Ravanat, 1998)

Le 4-HNE est majoritairement produit lors de la peroxydation lipidique des acides gras polyinsaturés en  $\omega 6$ , comme les acides gras linoléique (18:2) et arachidonique (20:4) (ESCODD, 2002).

**c. Les isoprostanes (PG):** Les isoprostanes ou composés "prostaglandines like" ont été décrits récemment comme des marqueurs de la peroxydation lipidique (Cracowski *et coll.*, 2000). Les isoprostanes résultent de l'attaque directe des ERO sur l'acide arachidonique des phospholipides, suivie d'une libération par une phospholipase. Ce sont des composés stables et spécifiques de la peroxydation lipidique (Roberts *et Morrow*, 2000).

#### II.6.2.2. Biomarqueurs de l'oxydation des protéines

L'oxydation protéique induit l'apparition de nouveaux groupements chimiques comme des hydroxyles et des carbonyles qui contribuent à altérer les fonctions des protéines. Ces modifications structurales peuvent entraîner des modifications fonctionnelles avec perte d'activité enzymatique (Spickett *et al.*, 2010).

L'oxydation du squelette carboné de la chaîne polypeptidique conduisant à une fragmentation des protéines et/ou à la formation de liaisons croisées intra- ou inter-chaînes et à l'apparition de groupements carbonylés ou dicarbonylés (Levine *et al.*, 1994). On peut également observer une oxydation des chaînes latérales des acides aminés, notamment de la cystéine et de la

méthionine, avec formation de ponts disulfures. (Davies, 1987; Stadtman, 1993; Grune *et al.*, 1998).

Les acides aminés et protéines peuvent subir d'autres modifications d'une façon indirecte comme la glyco-oxydation et la lipo-oxydation. Certains acides aminés comme la phénylalanine et la tyrosine peuvent subir un processus d'hydroxylation qui génère la formation d'ortho- et de méta-tyrosine dans le cas de la phénylalanine (Davies *et al.*, 1999).

D'autres marqueurs d'oxydation des protéines, en particulier le sulfoxyde de méthionine, la nitrotyrosine et l'ortho-tyrosine, ont été décrits comme présentant une meilleure spécificité (Davies *et al.*, 1999).

### II.6.2.3. Biomarqueurs de l'oxydation des acides nucléiques

Comme nous l'avons vu dans un des paragraphes précédents, de nombreuses lésions de l'ADN sont générées par l'attaque des radicaux libres (Pantke *et al.*, 1999).

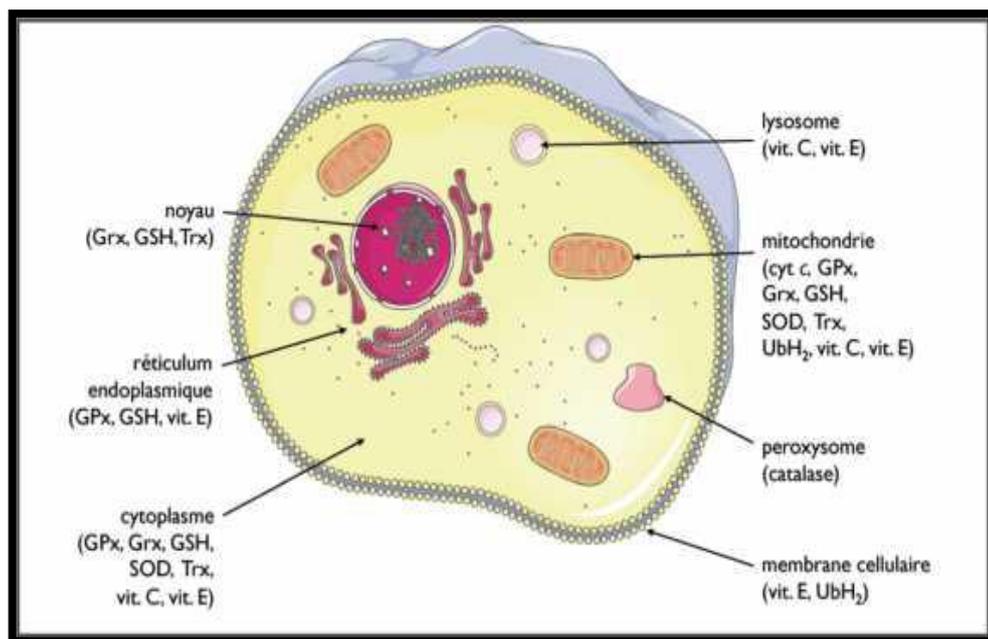
La lésion la plus étudiée est représentée par la 8-oxoGua. En effet, sa présence dans l'ADN peut aboutir à des transversions de GC vers TA, lorsqu'elle n'est pas réparée avant la réplication de l'ADN (Bonfont-Rousselot *et al.*, 2003). Ainsi, la présence de la 8-oxoGua peut mener à une mutation.

D'autres lésions sont potentiellement mutagènes: c'est le cas de la 2-hydroxyadénine (2-OH-Ade) qui peut entraîner des transversions de A vers T ou de A vers C et des transitions de A à G. La 5-hydroxycytosine (5-OH-Cyt) semble également avoir des propriétés de lésions prémutagéniques conduisant à une transition de GC vers AT et d'une transversion de GC vers CG (Peiro *et al.*, 2005).

## II.7. Défenses antioxydantes

Les radicaux libres sont produits spontanément et de manière continue au sein de notre organisme. Le maintien d'un niveau non cytotoxique d'ERO est assuré par des systèmes antioxydants. Un déficit ou un dysfonctionnement de ces systèmes engendre une augmentation des dommages tissulaires (Dröge, 2002; Mates *et al.*, 1999; Packer *et al.*, 1997; Powers & Lennon, 1999).

Nous considérons d'une part les molécules non enzymatiques apportée par l'alimentation sous forme de fruits et légumes riches en vitamines C, E, caroténoïdes, les polyphénols, ubiquinone, flavonoïdes et les oligo-éléments (comme le Zn ou le Se). D'autre part, un système enzymatique endogène détoxifiant composé des superoxyde-dismutases (SOD), des catalases (CAT), des glutathion peroxydases (GPX) etc...et aussi de substances endogènes comme le glutathion (GSH) (voir figure 13) (Ham & Liebler, 1995).



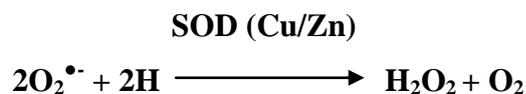
**Figure 13:** Distribution des antioxydants dans la cellule (Ham & Liebler, 1995).

### II.7.1. Défenses antioxydantes enzymatiques

Plusieurs enzymes et systèmes antioxydants endogènes agissent en synergie pour protéger les cellules des dommages oxydatifs. Leur fonction première est d'abaisser la quantité d'ERO ou des produits d'oxydation dans les cellules. Ces enzymes requièrent un ou plusieurs éléments trace (Zn, Cu, Mn, Se, Fe) comme cofacteurs pour leur activité catalytique.

#### II.7.1.1. Superoxyde dismutases (SOD)

Sont métalloprotéines, qui représentent une des premières lignes de défense contre le stress oxydant, assurent l'élimination de l'anion super-oxyde  $O_2^{\bullet-}$  par une réaction de dismutation, en le transformant en peroxyde d'hydrogène et en oxygène.



Trois formes de SOD existent chez les mammifères: une forme extracellulaire (Ec-SOD), une forme mitochondriale utilisant le manganèse comme cofacteur (Mn-SOD), et une forme cytosolique utilisant le cuivre et le zinc comme cofacteurs (Cu/Zn-SOD) (voir figure 14) (Fridovich, 1995).

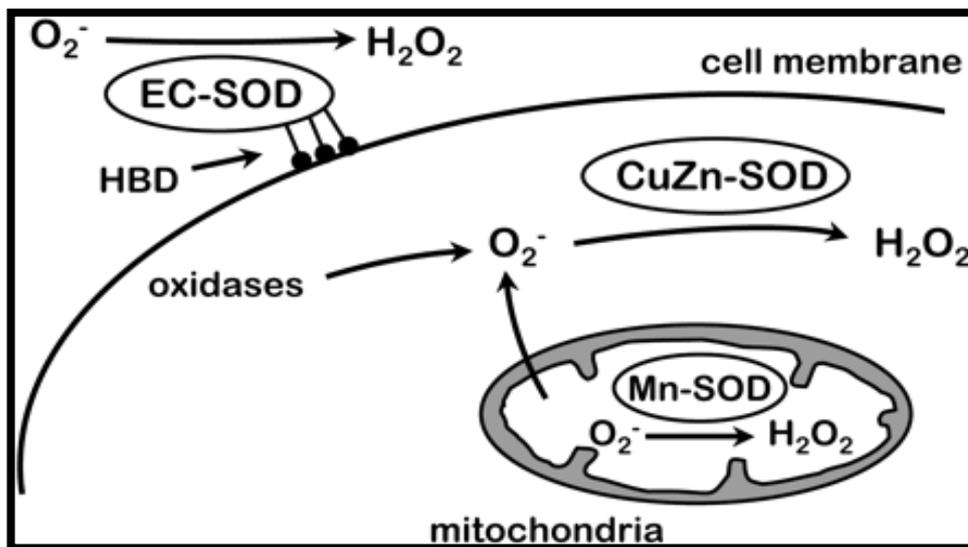


Figure 14: Les trois types de la SOD (Stevnsner *et al.*, 2002)

### II.7.1.2. Catalase (CAT)

Est une enzyme capable de transformer le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire. Avec le fer comme cofacteur, la catalase est essentiellement présente dans les peroxysomes hépatiques, mais aussi dans les hématies et les mitochondries de cellules cardiaques (Putnam *et al.*, 2000).



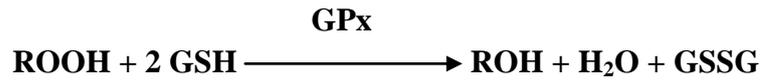
La catalase (CAT) est une enzyme hémique, c'est-à-dire qu'elle possède un atome de fer qui participe à la fabrication de l'hème. Sa masse molaire moléculaire est de 220 000 Da et une masse d'environ 240 KDa. La CAT possède 4 sous unités comprenant chacune un atome de fer sous forme Fe<sup>3+</sup> (Leibfrilz *et al.*, 2007).

### II.7.1.3. Glutathion peroxydase (GPx)

Est une séléno-enzyme (cinq isoformes) présente dans le sang, les membranes et le cytosol. En présence de son substrat spécifique, le glutathion réduit (GSH).

Elle réduit l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en H<sub>2</sub>O, les hydroperoxydes (ROOH) en alcools (ROH), et la dégradation peroxynitrite (Rotruck *et al.*, 1973).



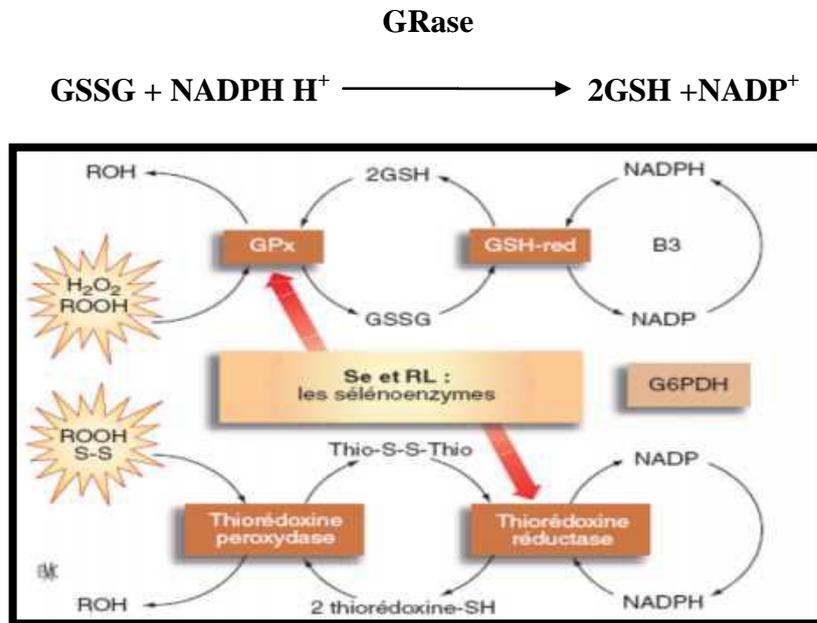


La GPx principale enzyme à sélénium (**Rotruck *et al.*, 1973**), utilise le GSH à titre de cofacteur. Il en existe plusieurs isoformes (**Ursini *et al.*, 1995**). Elles sont présentes dans le cytosol et la matrice mitochondriale (GPx-1), ou uniquement dans le cytosol (GPx-2), avec toutefois moins d'affinité pour l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (**Mullenbach *et al.*, 1988**). D'autres isoformes peuvent être extracellulaires (GPx-3), ou spécifiques de la membrane cellulaire (GPx-4) (**Takahashi *et al.*, 1987**).

La GPx-4 est impliquée spécifiquement dans la réduction des peroxydes lipidiques (**Ursini *et al.*, 1999**). Il existe aussi une isoforme spécifique des cellules digestives (GIGPx).

#### II.7.1.4. Glutathion réductase (GRase)

La glutathion réductase, quant à elle, a pour rôle de régénérer le GSH à partir du GSSG, et elle est couplée à l'oxydation du glucose-6 phosphate en 6-phospho gluconate source de 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 GSH-Px maintienne sa fonction (voir figure 15) (**Garait, 2006**).



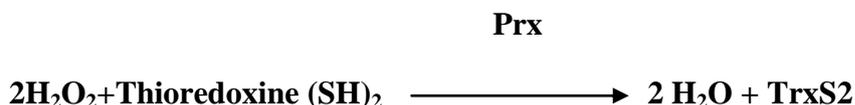
**Figure 15:** Interaction entre les sélénoenzymes et autres enzymes antioxydantes pour l'élimination des radicaux libres (**Roussel & Hininger Favier, 2009**).

**II.7.1.5. Glutathion S-transférase (GST)**

Réduit les hydroperoxydes en alcools, mais ne réduit pas l' $\text{H}_2\text{O}_2$ . (Garait, 2006).

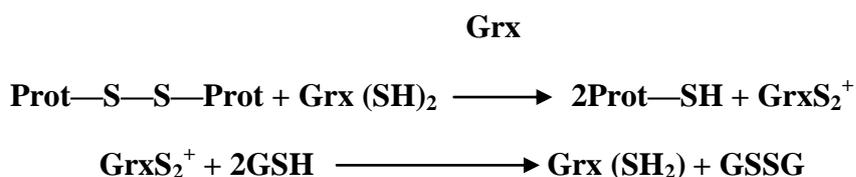
**II.7.1.6. Peroxyredoxine (Prx)**

Les peroxyredoxines (Prx) constituent une autre famille de peroxydases constituée de six membres, dont cinq (Prx I-V) possèdent deux sites catalytiques à base de cystéines. Ces peroxydases réduisent un grand nombre de molécules comme l' $\text{H}_2\text{O}_2$  et utilisent la thioredoxine (Trx) comme réducteur. Ces enzymes réduisent également les petites alkyl hydroperoxydes, le peroxyxynitrite et les hydroperoxydes dérivés de phospholipides ou d'acides gras. Leurs rôles physiologiques incluent à la fois des fonctions dans la lutte antioxydante et dans la signalisation intracellulaire (Rhee, 2005).

**II.7.1.7. Glutaredoxine**

Les glutaredoxines (Grx) sont aussi des dithiols [(SH)<sub>2</sub>]-disulfides oxydoréductases dont les fonctions catalytiques requièrent la présence de GSH. Elles catalysent la réduction des protéines disulfures en leurs formes sulfhydryles respectives. La forme oxydée de la Grx est alors réduite de nouveau grâce aux équivalents réduits du GSH.

La Grx-1 est spécifique du noyau et du cytosol, alors que la Grx-2 est présente dans la mitochondrie (Rouhier *et al.*, 2001).

**II.7.1.8. Le système thiorédoxine (Trx<sub>red</sub>)**

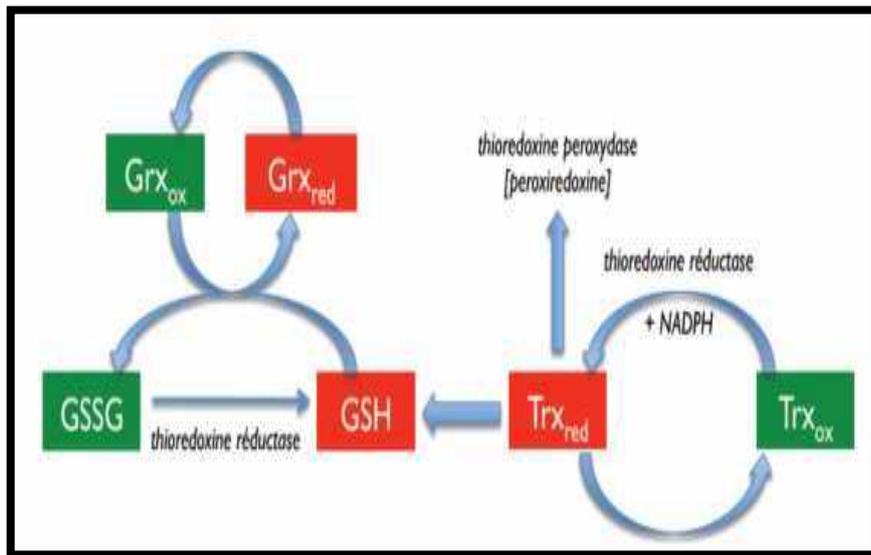
Le système thioredoxine comprend la Trx, la Trx réductase (Trx<sub>red</sub>) et le NADPH (Watson, 2004).

Le milieu intracellulaire est plutôt réducteur, les protéines contiennent des groupements thiols libres et les ponts disulfures sont rares. L'antioxydant majeur responsable du maintien des protéines à l'état réduit est la thiorédoxine qui sera régénérée par le NADPH sous l'action de la thiorédoxine réductase (TrxR) qui possède un groupement sélénocystéine dans son site actif.



Elle intervient dans la dégradation des peroxydes lipidiques et du peroxyde d'hydrogène, ainsi que dans la régénération du radical ascorbyl en acide ascorbique.

Les Trx de mammifères sont fonctionnellement associées à la glutarédoxine (Grx), et des interactions Trx-GSH ont récemment été décrites (voir figure 16), comme la formation de ponts disulfures entre les deux molécules (Casagrande *et al.*, 2000), mécanisme probablement pivot dans la signalisation cellulaire au cours du stress oxydant (Cummings, 2004).



**Figure 16:** Interaction entre les systèmes des thioredoxines, des glutarédoxines et du glutathion (Casagrande *et al.*, 2000).

### II.7.2. Défenses antioxydantes non enzymatiques

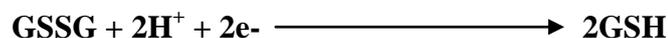
Les antioxydants non enzymatiques, sont des micronutriments exogènes apportés par l'alimentation ou des constituants endogènes. On distingue les antioxydants hydrosolubles comme le glutathion, l'acide ascorbique (vitamine C), l'acide urique, l'albumine et les antioxydants liposolubles: l'alpha tocophérol (vitamine E), l'ubiquinone (CoQ10), les caroténoïdes (Ballatori *et al.*, 2009).

### II.7.2.1. Glutathion

Le glutathion est un tripeptide formé par la condensation d'acide glutamique, de cystéine et de glycine : -L- Glutamyl -L- cystéinylglycine. Sa synthèse fait intervenir la-glutamylcystéine synthétase et la glutathione synthétase (**Ballatori et al, 2009**).

Il est présent dans de nombreux compartiments intracellulaires (cytosol, noyau, mitochondries) soit sous sa forme réduite (GSH) à une concentration intracellulaire de 0,1 à 1mM, soit sous sa forme oxydée (GSSG) à des concentrations dix fois moins importantes. Un rapport GSH/GSSG élevé est essentiel pour assurer une protection contre le stress oxydant (**Leibfrilz, 2007**).

Les principales propriétés biochimiques du GSH lui sont conférées par sa fonction thiol (**Del Corso et al., 2002**). Couplé à sa forme disulfure/oxydée GSSG, le GSH représente le tampon redox le plus important de la cellule, et son équilibre redox (ratio GSSG/2GSH)



Le potentiel antioxydant du glutathion lui vient de sa capacité à protéger les cellules de presque toutes les ERO ( $\text{OH}\cdot$ ,  $1\text{O}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{HOCl}$ ,  $\text{ONOO}$ ,  $\text{RO}^\circ$ ,  $\text{RO}_2^\circ$ ), en les réduisant directement, ou indirectement en tant que substrat de la réaction couplée à la GPx (**Evans, 1999; Griffith & Mulcahy, 1999**). Outre sa capacité à prévenir la propagation des ERO, le GSH peut réparer les attaques oxydatives sur les groupements thiol de la cystéine (**Dalle-Donne, 2003**).

### II.7.2.2. Le coenzyme Q et cytochrome c

Le coenzyme Q, appelé ubiquinone en raison de son ubiquité dans les cellules, (**Haleng et al., 2007**) est un composé hydrophobe qui se situe dans toutes les membranes cellulaires (essentiellement dans l'appareil de Golgi et les membranes lysosomales) (**Pobezhimova & Voinikov, 2000**). Il appartient à la chaîne de respiration mitochondriale et permet le transport d'électrons des complexes I et II vers le complexe III.

Il est également joue le rôle d'antioxydant dans sa forme totalement réduite (ubiquinol) (**Beyer, 1990; Ernster & Dallner, 1995**) où il inhibe la peroxydation lipidique en piégeant les radicaux peroxydes. Son effet anti-oxydant s'exerce aussi au niveau de l'ADN et des protéines, étant donné que le coenzyme Q est le seul anti-oxydant liposoluble endogène.

Le cytochrome c est présent dans l'espace intermembranaire mitochondrial, il y assure un rôle de «scavenger» en convertissant le superoxyde en oxygène (l'action inverse de la semi ubiquinone) (**Pereverzev, 2003**).

L'électron capté par le cytochrome c nouvellement réduit est transféré à l'oxygène via le cytochrome oxydase (complexe IV) pour former de l'eau.

### II.7.2.3. Les métallothionéines

Les métallothionéines sont des dérivées métalliques d'une protéine riche en soufre: la thionéine. Ces protéines régulent les concentrations intracellulaires en métaux (cuivre, zinc, cadmium, mercure) en les séquestrant, prévenant ainsi leur circulation sous leur forme libre pro-oxydante. Induites lors d'intoxications aux métaux notamment, les métallothionéines préviennent donc la mise en place de processus oxydatifs (**Petersen et al., 2008**).

### II.7.2.4. Acide lipoïque

L'acide lipoïque est pourtant un coenzyme liposoluble ubiquitaire aux puissantes propriétés antioxydantes. Il est à la fois capable de neutraliser diverses entités radicalaires ( $1O_2$ , HOCl, ONOO<sup>-</sup>), de chélater les métaux, de régénérer plusieurs types d'antioxydants (vitamines E et C, GSH et ubiquinol), mais aussi de protéger/réparer l'ADN des atteintes oxydatives (**Petersen et al., 2008**).

### II.7.2.5. La bilirubine

La bilirubine est le produit de dégradation des hèmes (ex: hémoglobine). Ses propriétés antioxydantes sont liées à sa capacité à lutter contre les radicaux ROO<sup>•</sup> et contre l' $H_2O_2$  (**Powers et Jackson, 2008**) et de piéger le  $1O_2$ , protégeant ainsi l'albumine et les acides gras liés à l'albumine des attaques radicalaires (**Neuzil et Stocker, 1993**).

### II.7.2.6. Acide urique

L'acide urique capable d'éliminer un grand nombre d'ERO ( $1O_2$ , OH<sup>•</sup>, HOCl,  $O_3$ , ONOO<sup>-</sup>, ROO<sup>•</sup>) (**Petersen et al., 2008**).

### II.7.2.7. La vitamine C (acide L-ascorbique)

La vitamine C ou acide L- ascorbique est une molécule soluble dans l'eau. Elle est synthétisée par les plantes et la plupart des animaux, excepté chez certains mammifères tel que l'homme. La vitamine C est, avant tout, un excellent piégeur des ERO (HO<sup>•</sup> ou  $O_2^{\bullet-}$ ). Elle inhibe également la peroxydation lipidique en régénérant la vitamine E à partir de la forme radicalaire issue de sa réaction avec des radicaux lipidiques et les dommages aux protéines et à l'ADN (**Kinsky, 1989; Bors et al., 1990**).

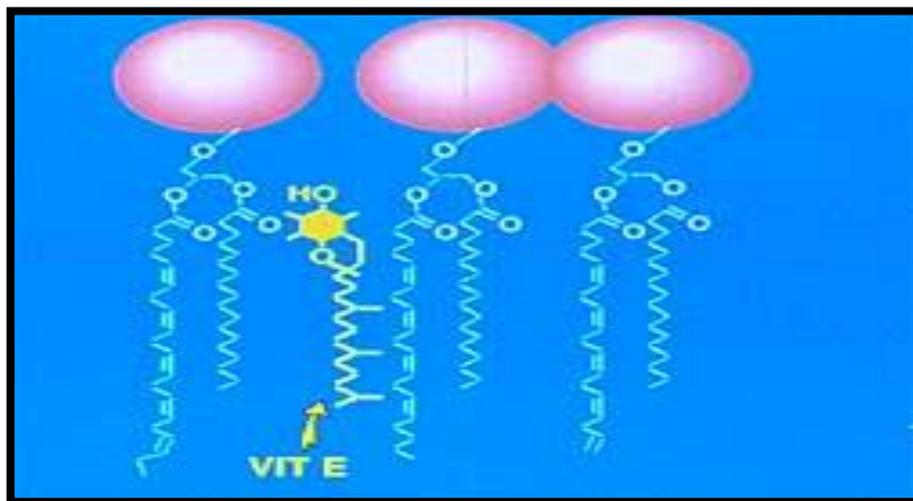
La vitamine C a également un pouvoir antioxydant indirect en recyclant les caroténoïdes et la vitamine E. D'un autre côté, la vitamine C permet le recyclage de  $Fe^{3+}$  en  $Fe^{2+}$  favorisant ainsi la réaction de Fenton et a donc de manière indirecte une action pro-oxydante.

### II.7.2.8. La vitamine E ( $\alpha$ - tocophérol)

La vitamine E est le nom commun utilisé pour toutes les molécules possédant des activités biologiques identiques à celles de la famille des tocophérols.

La forme naturelle de la vitamine E inclut quatre tocophérols isomères  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ , avec une activité antioxydante variable. L' $\alpha$ -tocophérol ( $\alpha$ -TocH) est la forme la plus active de la classe des tocophérols. Sa structure moléculaire comporte une extrémité hydrophile et une extrémité hydrophobe (voire figure 17).

La vitamine E est un antioxydant intra et extracellulaire, localisé dans les membranes et les lipoprotéines. Elle élimine les radicaux peroxydes intermédiaires, dérivés de la peroxydation lipidique (Mukai, 1993).



**Figure 17:** insertion de la vitamine E au sein de la membrane lipidique. (Mukai, 1993).

#### II.7.2.9. La vitamine A (famille des caroténoïdes)

La vitamine A est un nom générique pour les rétinoïdes et les provitamines A ou les caroténoïdes dont plusieurs centaines sont répertoriés. Les rétinoïdes (rétinol, rétinal et acide rétinoïque) sont présents dans les aliments d'origine animale (lait, foie, jaune d'œuf), alors que les provitamines A (béta-carotène, lutéines, lycopènes...) se rencontrent dans de nombreux fruits et légumes. Le béta-carotène est le principal précurseur de la vitamine A. Les autres caroténoïdes peuvent être de puissants antioxydants, mais ils sont moins connus et abondants. La vitamine A est responsable de la neutralisation d'anion superoxyde, de peroxyde, de radicaux lipidiques et son action se fait dans les milieux lipidiques.

La vitamine A agit sur les ERO en formant un radical de vitamine A qui pourra agir comme antioxydant en réagissant avec un autre radical pour former un non radical.

#### II.7.2.10. caroténoïdes

Les caroténoïdes sont également des molécules liposolubles produites par les organismes photo autotrophes et qui doivent être acquis par l'alimentation chez les animaux. Leur potentiel antioxydant pour lutter contre la peroxydation lipidique a été démontré très tôt et ils sont capables de réagir avec les radicaux libres de trois manières : par le transfert d'électron,

d'hydrogène ou la liaison avec le radical. Ils sont également capables de régénérer la vitamine E et sont eux-mêmes régénérés par la vitamine C.

Parmi d'autres caroténoïdes intéressants pour leurs propriétés antioxydantes, citons également le lycopène présent dans la peau de la tomate, la lutéine, le  $\beta$ - cryptoxanthine, la zéaxanthine (**Rissanen *et al.*, 2003**).

### **II.7.2.11. Oligo éléments**

Malgré leur potentiel pro-oxydant, sous leur forme libre, les métaux se comportent indirectement comme des antioxydants en vertu de leurs propriétés au sein des métalloenzymes, c'est à dire des enzymes possédant dans leur structure, ou fixant sur certains de leurs sites actifs, des ions métalliques (**Ganther, 1999**) Par exemple:

Le cuivre (Cu), le zinc (Zn), le manganèse (Mn), le sélénium (Se) et le fer (Fe) sont des métaux essentiels dans la défense contre le stress oxydant. 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.

### **II.7.2.12. Les polyphénols**

Ils constituent une famille importante d'antioxydants présents dans les végétaux, l'alimentation. Ils sont présents sous forme d'anthocyanine dans les fruits rouges et le vin rouge, sous forme de flavonoïdes dans les agrumes, l'huile de lin et sous forme d'épicatéchine dans le vin, le thé, le chocolat, les pommes, les oignons et les algues brunes. Globalement, ce sont d'excellents piègeurs des EOA et de très bons chélateurs des métaux de transition comme le fer et le cuivre.

### **II.7.2.13. *Thymus numidicus***

Environ 35 000 espèces de plantes sont employées dans le monde à des fins médicinales, ce qui constitue le plus large éventail de biodiversité utilisé par les êtres humains (**Elqaj *et al.*, 2007**). Les médicaments à base de plantes sont considérés comme peu toxiques et doux par rapport aux médicaments pharmaceutiques. Les propriétés antimicrobiennes des plantes aromatiques et médicinales sont connues depuis l'antiquité. Toutefois, il aura fallu attendre le début du 20ème siècle pour que les scientifiques commencent à s'y intéresser (**Yano *et al.*, 2006**). Récemment, l'attention s'est portée sur les herbes et les épices comme source d'antioxydants, qui peuvent être employés pour se protéger contre les effets du stress oxydant (**Mata *et al.*, 2007**).

De nombreuses études ont révélé que les parties aériennes des espèces du genre *Thymus* sont riches en plusieurs constituants dont la teneur varie selon la variabilité des conditions géographiques, climatiques, de séchage, de stockage et des méthodes d'études (extraction et

détection). Les flavonoïdes sont présents en abondance chez le genre *Thymus*. Ils sont présents sous forme d'hétérosides ou, le plus généralement, à l'état libre (aglycones)(**Dibong et al., 2011**).

#### **II.7.2.13.1. Genre *Thymus***

##### **A. Origine du nom**

le nom thym proviendrait bien du latin que du grec *Thymus* (parfumer en latin) et *Thumus* (courage en grec).

##### **B. Distribution géographique**

###### **B.1. Dans le monde**

Le genre *Thymus* est l'un des 250 genres les plus diversifiés de la famille des labiées (**Naghibi et al., 2005**). Il existe près de 350 espèces de thym réparties entre l'Europe, l'Asie de l'ouest et la méditerranée (**Dob et al., 2006**). 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**). On peut le trouver également en Sibérie et même en Himalaya. Selon une étude menée par Nickavar et al., 2005 environ 110 espèces différentes du genre *Thymus* se concentrent dans le bassin méditerranéen (**Nickavar et al., 2005**).

###### **B.2. En Algérie**

Le thym comprend plusieurs espèces botaniques réparties sur tout le littoral et même dans les régions internes jusqu'aux zones arides (**Mebarki, 2010**). Il est représenté en Algérie par de nombreuses espèces qui ne se prêtent pas aisément à la détermination en raison de leurs variabilités et leur tendance à s'hybrider facilement. Le tableau 2 montre la localisation des principales espèces de thym en Algérie.

**Tableau 2:** Localisation des principales espèces de genre *Thymus* en Algérie (Mebarki, 2010).

Espèces	Découverte par	Localisation
<i>Thymus capitatus</i>	Hoffman et Link	Rare dans la région de Tlemcen
<i>Thymus fontanesii</i>	Boiss et Reuter	Commun dans le Tell Endémique Est Algérie-Tunisie
<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 Tell constantinois

### C. Place dans la systématique

Le tableau 3 montre la classification de *Thymus numidicus*.

**Tableau 3:** classification de *Thymus numidicus* (Naghibi et al., 2005).

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

### D. 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-noeuds 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 (voir figure 18). Les fleurs font réunies à l'extrémité

des rameaux en épis courts, capité, garnis de bractées ovales, lancéolées, aiguës, 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 (Nickavar *et al.*, 2005).



**Figure 18:** Espèce *Thymus numidicus* Poiret (Nickavar *et al.*, 2005).

### E. Potentiel antioxydant

#### E.1. Principes actifs du Thym

- **Les acides phénoliques:** acide caféique (Cowan, 1999), acide rosmarinique (Takeuchi *et al.*, 2004);
- **Les flavonoïdes:** hespéridine, eriotrécine, narirutine (Takeuchi *et al.*, 2004), lutéoline (Bazylko et Strzelecka, 2007);
- **Les polyphénols:** tannin (Cowan, 1999 ; Özcan et Chalchat, 2004).

L'activité anti-radicalaire des flavonoïdes est conditionnée par (Kale *et al.*, 2008 ; Mladinka *et al.*, 2010 ; Rufer et Kulling, 2006):

- pour le cycle C: la présence d'une double liaison en 2,3 avec un groupement oxo en 4, et une hydroxylation en 3.
- pour le cycle A: une dihydroxylation en 5,7.
- pour le cycle B: une ortho-dihydroxylation.

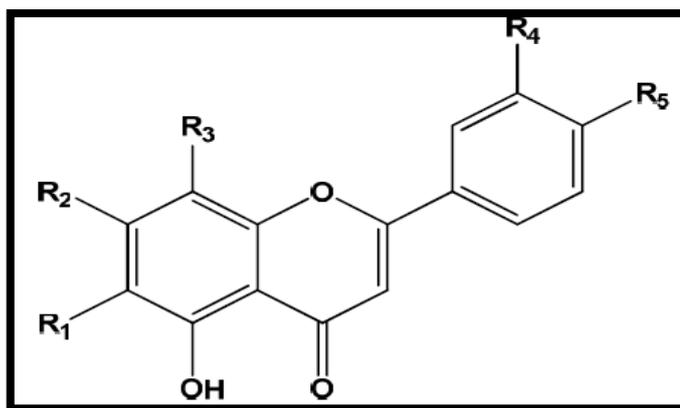
Le potentiel antioxydant des flavonoïdes peut aussi s'expliquer par la capacité de chélation des ions métalliques par les flavonoïdes (Halbwirth, 2010; Leopoldini *et al.*, 2010). Cette capacité est très largement dépendante du nombre d'hydroxyles dans la molécule (Halbwirth, 2010). Les 3 sites de chélation principaux se situent (Mladinka *et al.*, 2010):

- Entre l'hydroxyle en 5 et le carbonyle en position 4.
- Entre l'hydroxyle en position 3 et le carbonyle en 4.
- Entre les deux hydroxyles en position 3' et 4' sur le cycle B.

Les flavonoïdes peuvent aussi inhiber des lipoxygénases (LOXs), soit directement, soit indirectement par la chélation d'ions métalliques. Les lipoxygénases catalysent l'oxydation d'acide arachidonique en acides gras polyinsaturés (Mladinka *et al.*, 2010).

## E.2.Travaux antérieurs

Les travaux sur *Thymus numidicus* ont mené à l'isolement et la détermination de cinq flavonoïdes de type flavone (voir figure II-19) rassemblés dans le tableau 4 (Benkiniouar *et al.*, 2010)



**Figure 19:** structure de flavonoïde de type flavone(Benkiniouar *et al.*, 2010).

**Tableau 4 :** Les flavonoïdes isolés de *Thymus numidicus* Poiret (Benkiniouar *et al.*, 2010).

Composés	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>
5,7,4'-trihydroxyflavone (Apigénine)	H	OH	H	H	OH
5,7,3',4' tetrahydroxyflavone (Lutéoline)	H	OH	H	OH	OH
5,4'-dihydroxy-6,7,8 triméthoxyflavone (Xanthomicrole)	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H	OH
5,3',4'-trihydroxy-6,7,8 triméthoxyflavone (Sideritoflavone)	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OH	OH
5-hydroxy-6,7,3',4'-tetraméthoxyflavone (5-Desméthylsinensétine)	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>

**Deuxième partie**  
**Partie expérimentale**

L'étude suivante a été menée dans le but de vérifier l'hypothèse suivante: l'effet de *Thymus nemudicus* sur la toxicité hépatique induite par l'alloxane.

Le but de cette étude est d'évaluer, chez des souris, les variations des paramètres biochimiques sanguins, enzymes anti oxydantes tissulaires, les produits de la peroxydation lipidique, avec traitement par l'alloxane, avec traitement par différentes doses de *Thymus nemudicus*.

### A. Animaux

Les animaux utilisés dans cette expérience sont des souris mâles *Mus Musmusculus* de la souche BALB/C, en nombre de 42 souris provenant de l'institut pasteur, âgés de 02 à 03 semaines d'un poids vif moyen de 30.5g. Ce sont des mammifères de l'ordre des rongeurs. Largement utilisés dans divers domaines de la recherche (**Tableau 5**).

**Tableau 5 :** Classification des souris (Orsini *et al.*, 1983).

<b>Règne</b>	Animale
<b>Embranche</b>	Vertébrés
<b>Classe</b>	Mammifère
<b>Ordre</b>	Rongeurs
<b>Sous-ordre</b>	Myomorphes
<b>Famille</b>	Muridés
<b>Genre</b>	<i>Mus</i>
<b>Espèce</b>	<i>Mus musculus</i>
<b>Nom</b>	Souris



**Figure 20:** Souris blanches mâles.

### B. Protocole

#### 1. Conditions d'élevage

Ces souris ont été soumises à une période d'adaptation de 15 jours, aux conditions de l'animalerie ; à une température de  $25^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$  et une photopériode naturelle. Étaient mis dans des cages spéciales à souris /hamsters, celles-ci sont tapissées d'une litière constituée de copeaux de bois. Les cages ont été nettoyées et la litière changée tous les jours jusqu'à la fin de l'expérimentation, et suivie l'alimentation spécifique et l'eau était remplie dans des biberons.



**Figure 21:** Conditions d'élevage des Souris.

#### 2. Traitement des souris

Après une période d'adaptation de 15 jours nous avons commencé le traitement. Ces souris ont été réparties en six (06) lots égaux à raison de sept (07) rats par lot, il s'agit:

**Lot I ou Témoin sain (T):** souris témoins ont reçu une eau physiologique par injection intra péritonéale par jour pendant 21 jours.

**Lot II Traité par TN:** souris ont reçu par voie intra péritonéale à une dose de  $50\text{mg}/\text{kg pc}/\text{j}$  pendant 21 jours.

**Lot III:** souris ont reçu une dose unique d'alloxane ( $\text{C}_4\text{H}_4\text{N}_2\text{O}_5$ ), de  $150\text{mg}/\text{kg}$  par injection intra péritonéale (**Rotruck et al., 1973**).

**Lot IV:** souris ont reçu une injection intra péritonéale d'alloxane à une dose unique de  $150\text{mg}/\text{kg}$  (**Rotruck et al., 1973**), puis un traitement par le TN à une dose de  $30\text{mg}/\text{kg pc}/\text{j}$  par voie intra péritonéale pendant 21 jours.

**Lot V:** souris ont reçu une injection intra-péritonéale d'alloxane à une dose unique de 150mg/kg (Rotruck *et al.*, 1973), puis un traitement par le TN à une dose de 50mg/kg pc/j par voie intra péritonéale pendant 21 jours.

**Lot VI:** souris ont reçu une injection intra péritonéale d'alloxane à une dose unique de 150mg/kg (Rotruck *et al.*, 1973), puis un traitement par le TN à une dose de 100mg/kg pc/j par voie intra péritonéale pendant 21 jours.

### 3. Sacrifices et prélèvements d'organes

#### 3.1. Prélèvement sanguin

Après 21 jours de traitement les 6 lots ont été sacrifiés (par décapitation), le sang est immédiatement recueilli de tube sec étiquetés, ce dernier est centrifugé à 3000 tours/min pendant 10 minutes, les échantillons obtenus ont été stockés au congélateur à  $-80^{\circ}\text{C}$  jusqu'à l'analyse.



**Figure 22:** Le sacrifice des souris.

### 3.2. Prélèvement des organes

Les animaux sacrifiés ont été pesés puis disséqués pour le prélèvement le foie.



**Figure 23:** Prélèvement du foie.

Après la dissection, le foie sont prélevé, rincer l'organe avec l'eau physiologique préparé comme suite: 0,9g de NaCl dans 100ml d'eau distillée. Le foie stocké selon la méthode suivante: la moitié au congélateur (-80°C) pour le dosage des paramètres du stress oxydant.

La Figure 24 schématise les différentes étapes du protocole expérimental utilisé.

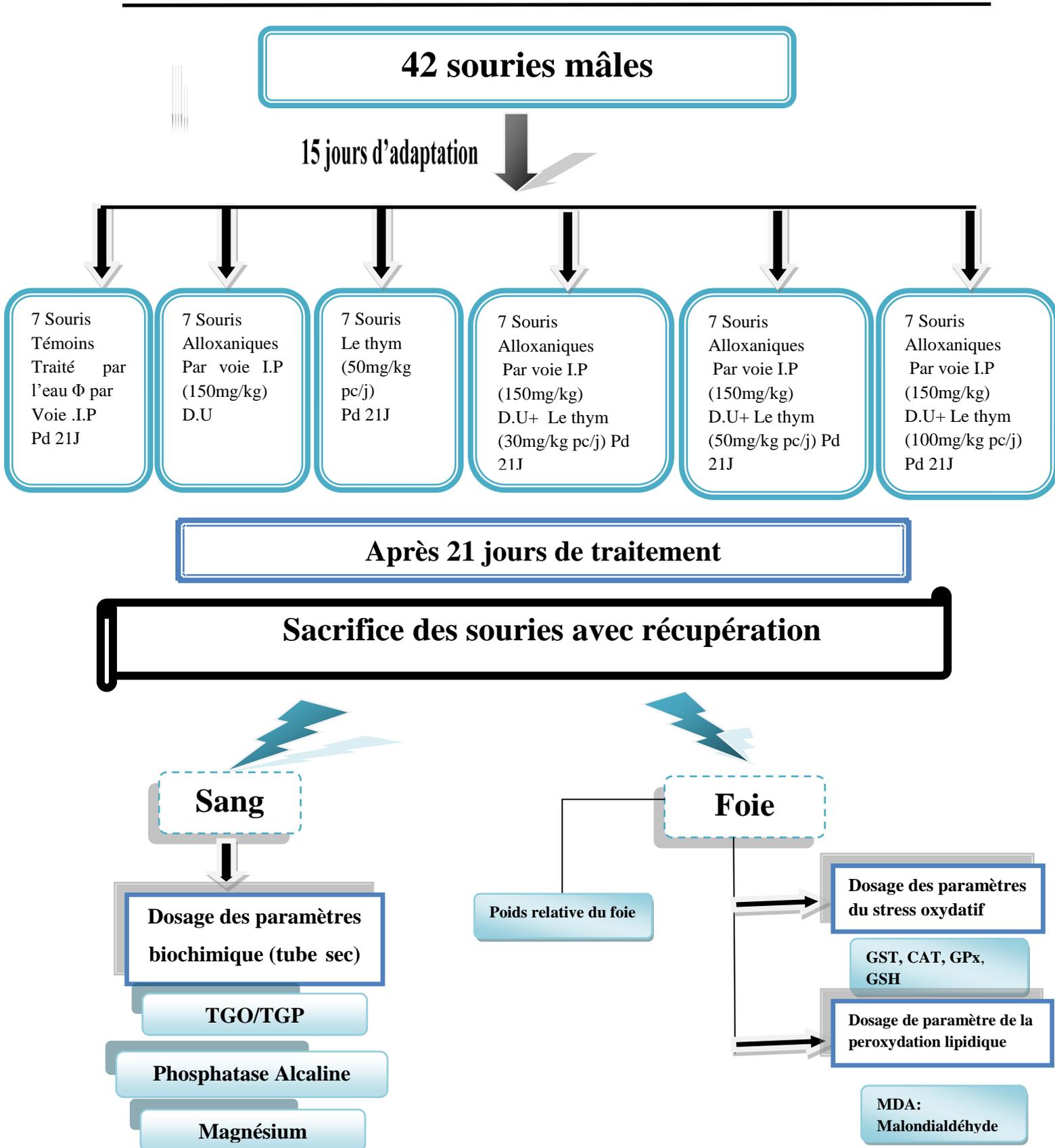


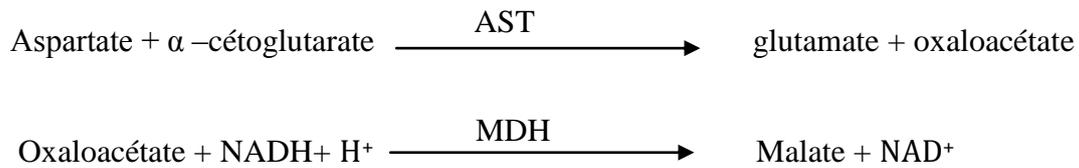
Figure 24: Schéma récapitulatif de protocole expérimental.

## C. Paramètres analysés et méthodes

### 1. Méthodes de dosage des paramétrés biochimiques

#### 1.1. Transaminase glutamate oxaloacétate (TGO)

Méthode cinétique de dosage des transaminases sériques selon la fiche technique Spinreact. Transaminase glutamate oxaloacétate (TGO) appelée aussi aspartate aminotransférase (AST) catalyse le transfert réversible d'un groupe aminé à partir de l'aspartate au  $\alpha$ -cétoglutarate formant le glutamate et l'oxaloacétate. L'oxaloacétate est réduit au malate par la malate déshydrogénase (MDH) et le NADH, H<sup>+</sup> (Murray, 1984):

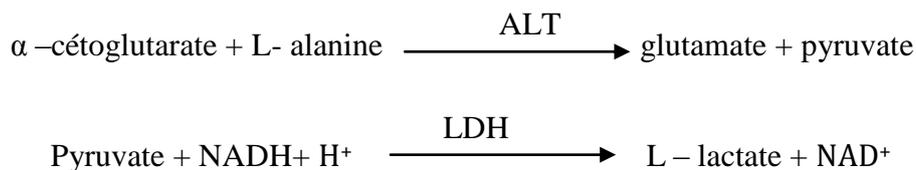


Dans un tube sec 100 $\mu$ l d'échantillon (sérum) sont additionnés à 1ml de réactif de travail [R2 (NADH : 0.18mmol/l, Lactate déshydrogénase : 800 U/L, Malate déshydrogénase(MDH) : 600 U/L,  $\alpha$  cétoglutarate: 12 mmol/l) dissout dans le tampon ; R1 (TRIS pH7.8 : 80 mmol/l, Aspartate: 200 mmol/l)], agitation, incubation pendant 01 minutes. Lecture de l'absorbance(A) à  $\lambda=340$  nm chaque minute pendant 03 minutes.

$$\Delta A/\text{min} \times 1750 = \text{U/L de TGO}$$

#### 1.2. Glutamate pyruvate transaminases (TGP)

Méthode cinétique de dosage des transaminases sériques selon la fiche technique Spinreact. Glutamate pyruvate transaminases (TGP) ou Alanine aminotransférase (ALT) catalyse le transfert réversible de groupement aminé de l'alanine à l' $\alpha$ -cétoglutarate formant le glutamate et pyruvate. Ce dernier est réduit en lactate par l'enzyme lactate déshydrogénase (LDH) et le NADH selon les réactions (Murray, 1984):



Dans un tube sec 100µl d'échantillon (sérum) sont additionnés à 1ml de réactif de travail [R2 (NADH:0.18mmol/l, Lactate déshydrogénase : 1200 U/L, α cétooglutarate: 15 mmol/l) dissout dans le tampon ; R1 (TRIS pH7.8 : 80 mmol/l, L-Alanine: 500 mmol/l)], agitation, incubation pendant 01 minutes. Lecture de l'absorbance (A) à λ=340 nm chaque minute pendant 03 minutes.

$$\Delta A/\text{min} \times 1750 = \text{U/L de TGP}$$

### 1.3. Phosphatase alcaline

La phosphatase alcaline (PAL) catalyse l'hydrolyse de p-nitrophenyl phosphate à pH 10.4, en libérant p-nitrophenol et le phosphate (**Wenger, 1984**) selon la réaction :



La formation de p-nitrophénol est mesurée photométriquement, où elle est proportionnelle à l'activité catalytique de la phosphatase alcaline dans le sérum selon la fiche technique Spinreact.

Dans un tube sec 20µl d'échantillon (sérum) sont additionnés à 1.2 ml de réactif de travail [R2 (α Nitrophénylphosphate : 10 mmol/l), dissout dans le tampon; R1 (Diethanolamine pH10.4: 1 mmol/l, Chloride se magnésium: 0.5 mmol/l)], agitation, incubation pendant 01minutes. Lecture de l'absorbance (A) à λ=405 nm chaque minute pendant 03 minutes.

$$\Delta A/\text{min} \times 3300 = \text{U/L de ALP}$$

### 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 & 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 à température ambiante pendant 05minutes. Lecture de la densité optique à λ=546 nm contre un blanc réactif avec utilisation d'un étalon.

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

### 2. Méthodes de dosage des paramètres du stress oxydatif

#### 2.1. Préparation de l'homogénat

Un gramme de foie de chaque souris des différents groupes étudiés, a été utilisé. Après broyage et homogénéisation des tissus dans 8ml de TBS (pH 7.4), on a procédé à une centrifugation de la suspension cellulaire (9000 tours/min, 4°C, 15 min), puis le surnageant obtenu est aliquoté dans des tubes éppendorfs puis conservés à -80°C en attendant d'effectuer les dosages des paramètres du stress oxydatif.

#### 2.2. Dosage des protéines tissulaires

##### ❖ Principe

La concentration des protéines est déterminée selon la méthode de **Bradford (1976)**. 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 (**Bradford, 1976**).

##### ❖ Procédure

- Prélever 20µl de l'homogénat.
- Ajouter 1 ml du réactif coloré (BBC).
- Agiter et laisser 5 min pour la stabilisation de couleur.
- 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) (Courbe d'étalonnage: voir annexe).

#### 2.3. Dosage du glutathion

##### ❖ Principe

Le dosage du glutathion est réalisé selon le procédé de **Weckbeker et Cory (1988)**. Le principe de ce dosage repose sur la mesure de l'absorbance de l'acide 2-nitro-5-mercaptopurique. Ce dernier résulte de la réduction de l'acide 5, 5'-dithio-bis-2-nitrobenzoïque (réactif d'Elleman) par les groupements (-SH) du glutathion. Une fois préparé, l'homogénat doit subir une déprotéinisation (par l'acide sulfosalicylique 0.25%) afin de garder uniquement les groupements-SH spécifique du glutathion (**weckbeker et Cory, 1988**)

❖ **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 l'acide 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoïque (DTNB) à 0.01M dissous dans le méthanol absolu.
- Laisser pendant 5min à température ambiante. puis lecture de la DO à  $\lambda = 412$  nm.

❖ **Calcul**

La concentration en GSH est obtenue par la formule suivante :

$$[GSH] = \frac{DO \times 1 \times 1.525}{13100 \times 0.8 \times 0.5 \text{ mg de pr t}} \text{ nM GSH/mg pr t}$$

**DO** : Densité optique ;

**1** : Volume total des solutions utilisées de la déprotéinisation (0.8 ml homogénat + 0.2 ml 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 un 1 ml;

**0.5** : Volume du surnageant trouvé dans un 1.525 ml.

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

**2.4. Glutathion peroxydase**

❖ **Principe**

L'activité enzymatique de la glutathion peroxydase (GPx) a été mesurée par la méthode de **Flohe et Gunzler (1984)**. Cette méthode est basée sur la réduction de peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en présence de glutathion réduit (GSH), ce dernier est transformé en (GSSG) sous l'influence de la GPx selon la réaction suivante (**Flohe et Gunzler, 1984**):



❖ **Protocole expérimentale**

- Dans un tube sec, 0.2 ml de surnageant est additionnée à 0.4 ml de GSH a 0.1 mM (réaction enzymatique) + 0.2 ml de KNaHPO<sub>4</sub> à 0.067 M (tampon d'extraction pH 7.8).
- Le tube blanc contient 0.4 ml de GSH + 0.2 ml de KNaHPO<sub>4</sub> (réaction non enzymatique).
- Incubation au bain marie à 25° C pendant 05 min puis addition de 0.2 ml d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1.3mM) pour initier la réaction.
- Incubation 10 min.
- Addition de 1ml de TCA 1% T pour arrêter la réaction.
- Le mélange se met dans la glace pendant 30 min. Centrifugation durant 10 min a 3000t/min. 0.48 ml de surnageant sont placés dans une cuve est additionnés de 2.2 ml de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0.32M) + 0.32 ml de DTNB à 1mM.
- Mesure de la densité optique à 412 nm dans les 05 min.
- La détermination (calculé) de l'activité de la GPx se fait de la façon suivante :

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>

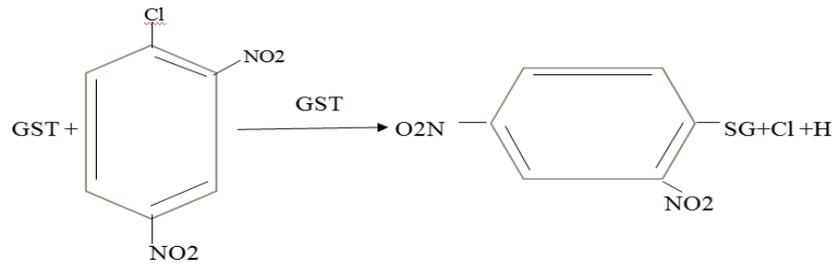
$$X = \frac{(DO_e - DO_b) \times 0.04}{DO_b} = \text{quantité de GSH réduite disparue (oxydée)}.$$

L'activité de la GPx = La quantité de GSH réduit disparue X  $\frac{5}{\text{La concentration de protéine}}$

**2.5. Glutathion-S- transférase**

❖ **Principe**

La mesure de l'activité de la 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-Chloro-2,4 di nitrobenzène) en présence d'un cofacteur le glutathion (GSH), la conjugaison entraîne la formation d'une molécule nouvelle ; 1-S-Glutathionyl 2-4 Di nitrobenzène (**Habig et al., 1974**). Permettant de mesurer l'activité de GST selon la réaction suivante:



### ❖ Protocole expérimentale

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. Les échantillons sont homogénéisés dans 1 ml de tampon phosphate (0.1 M, pH 6). L'homogénat est centrifugé à 1400 t/min pendant 30 min et le surnageant récupéré servira comme source d'enzymes. Le dosage consiste à faire réagir 200 µl du surnageant avec 1.2 ml du mélange CDNB (1mM), GSH (5mM). La lecture des absorbances est effectuée pendant une minute et chaque 15 secondes à une longueur d'onde de 340 nm contre un blanc contenant 200 µl d'eau distillée remplaçant la quantité de surnageant.

La concentration de la GST est obtenue par la formule suivante :

$$\text{GST (nmol GST /min/mg de protéine)} = \frac{(\text{DO échant/min} - \text{DO blanc/min})}{9,6 \times \text{mg de protéine}}$$

- **Do** : Densité optique de l'échantillon /min ;
- **Do/min blanc** : Densité optique du blanc /min ;
- **9.6** : Coefficient d'extinction du GSH-CDNB exprimé en mM. Cm.

## 2.6. 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<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) toxique pour la cellule en eau et en oxygène (Aebi, 1984).



L'activité de la catalase (CAT) est mesurée à 240 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV/visible par la variation de la densité optique consécutive à la dismutation du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en faisant réagir dans 100 mM de tampon phosphate pendant 1 min à pH 7.4, 200 µl d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (500mM) sur 20 µl de l'homogénat, à une température d'incubation de 25°C. Les résultats ont été exprimés en µ moles d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par minute et par mg de protéines.

On note que :

- La lecture contre le blanc réactifs (Tampon phosphate)
- La quantité du surnageant doit être déterminée en fonction de la quantité de protéines qui doit être comprise entre 1 et 1,5 mg/ml, soit une quantité de 10 à 20 µl de solution diluée.
- L'activité décroît rapidement, il est important de mettre toujours le même temps de pipetage et le moment où on place la cuve au spectrophotomètre.
- La lecture de l'absorption se fait après 15 secondes de délai et durent 60 s de mesure.
- Le coefficient d'extinction d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> étant de 0,043 mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>.

L'activité de la CAT peut être calculée selon l'équation suivante:

$$\text{Activité CAT } (\mu\text{mol de H}_2\text{O}_2/\text{min}/\text{mg prot}) = \frac{\Delta \text{DO} \times d}{\varepsilon \times X \times L \times 0.02}$$

Avec :

- $\Delta \text{DO}$  : variation de la densité optique par minutes, c'est-à-dire pour
- **AI** (Absorbance initiale): 15s
- **AF** (Absorbance finale): 1min

On fait: (AI - AF) × 4/3 par min

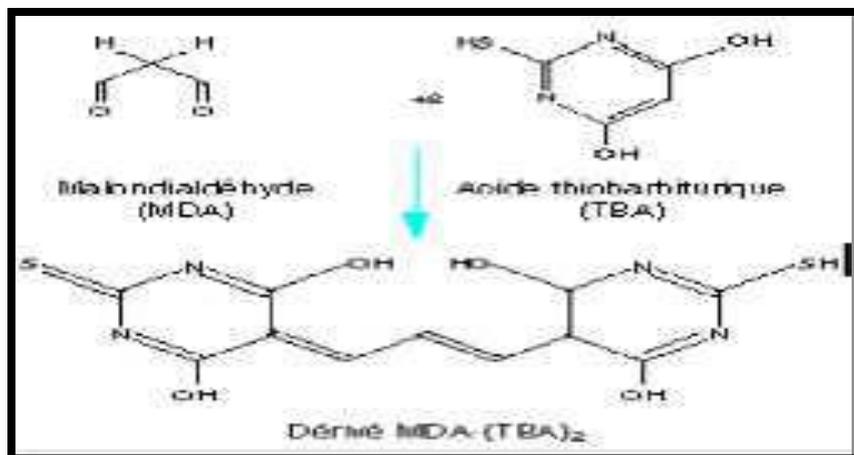
- **d** : dilution de l'échantillon au début
- $\varepsilon$  : Coefficient d'extinction moléculaire de l'eau oxygénée,  $\varepsilon \text{ H}_2\text{O}_2 = 0.043 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1} = 0,043 \mu\text{mol cm}^{-1}\cdot\text{ml}^{-1}$
- **L** : largeur de la cuve (longueur du Trajet optique) en cm
- **X** : quantité des protéines en mg/ml.

### 2.7. Malondialdéhyde (MDA)

#### ❖ Principe

Le 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 3 ou 4 doubles 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)**.

Le principe de ce dosage est basé sur la condensation de MDA en milieu acide et à chaud avec l'acide thiobarbiturique, pour former un pigment (rose). Ce chromogène peut être donc mesuré par spectrophotométrie à 530 nm (**Esterbauer *et al.*, 1992**) (Voir figure 30).



**Figure 25:** Réaction du dialdéhyde malonique avec l'acide thiobarbiturique.

❖ **Protocole expérimentale**

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

Lecture de la densité optique à  $\lambda=530$  nm.

La concentration du MDA est calculée selon la loi de Beer-Lambert (DO = E.C.L):

$$C(\text{nmol/mg de protéine}) = \frac{DO \cdot 10^6}{\epsilon \cdot L \cdot \chi \cdot Fd}$$

- **C** : Concentration en nmoles /mg de protéines;
- **DO** : Densité optique lue à 530 nm;
- **$\epsilon$**  : Coefficient d'extinction molaire du MDA = 1.56 10<sup>5</sup> M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>;
- **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 statistique

- Ces calculs ont été effectués à l'aide du logiciel MINITAB d'analyse et de traitement statistique des données (Version13, 31).

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

- Nous avons déterminé, grâce aux statistiques élémentaires; les paramètres statistique pour chaque lot expérimental. Les données ont été analysées par l'analyse de la variance à un critère de classification (ANOVA).

- A l'aide du test du Student, nous avons comparé les moyennes deux a deux des différents lots.

# Résultats

**A. Étude du poids corporel et poids relatif du foie**

Les résultats obtenus par cette étude sur l'évolution du poids corporel et du poids relatif du foie sont mentionnés sur le tableau 06.

**Tableau 06 :** Variation du poids corporel et poids relatif du foie (g/100g de poids corporel) chez les souris témoins et traités après 21 jours de traitement.

Paramètres	Lots expérimentaux					
	T (n=7)	TN (50mg/kg pc/j) (n=7)	Alloxane (n=7)	A+TN 30mg/kg pc/j (n=7)	A+TN 50mg/kg pc/j (n=7)	A+TN100mg /kg pc/j (n=7)
<b>Poids initial (g)</b>	31.71± 2.84	32.34± 2.72	33.64± 0.70	32.49±2.17	34.29±1.44	34.11± 1.45
<b>Poids final (g)</b>	34.74±2.04***	36.40±1.89***	41.52±1,77***	33.98±2.62	36.67±1.96*	37.03±2.26**
<b>Gain du poids (g)</b>	3.03	4.06	7.88	1.49	2.38	2.91
<b>Poids relatif du Foie (%)</b>	6.11±0.11	5.50±0,20	3.83±0.19 <sup>a***b*</sup>	6.19±0.23 <sup>c***</sup>	6.24±0,17 <sup>c***</sup>	5.59±0.10 <sup>c*</sup>

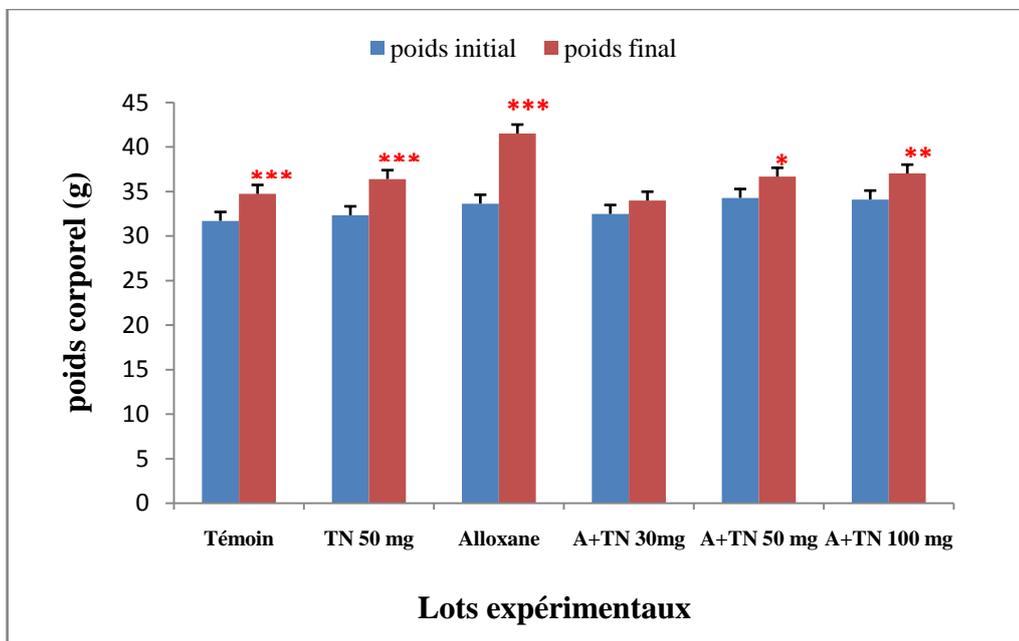
a : comparaison avec le groupe Témoin, b : comparaison avec le groupe traité par le TN (50mg/kg pc/j), c : comparaison avec le groupe traité par l'alloxane, d : comparaison avec le groupe alloxanique traité par le TN (30mg/kg pc/j), e : comparaison avec le groupe alloxanique traité par TN (50mg/kg pc/j).

P : seuil de signification ; \* : Différence significative (P ≤0,05), \*\* : Différence hautement significative (p≤0.01), \*\*\* : Différence très hautement significative (P ≤0,001).

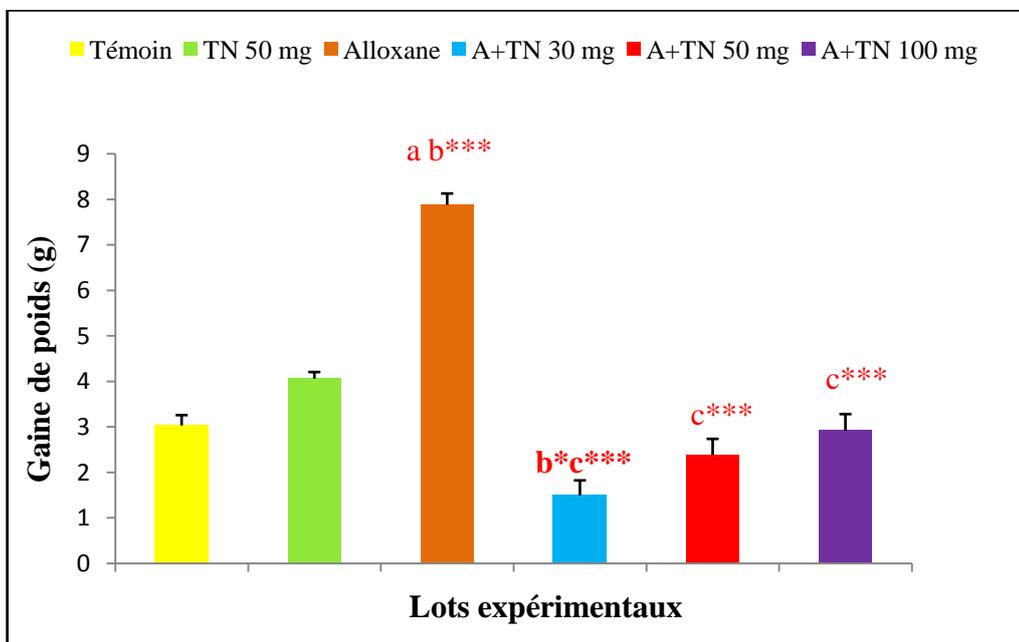
**A.1.Poids corporel**

En mesurant ce paramètre, nous voulions savoir est ce que le Thymus numidicus à un effet sur l'évolution du poids corporel des sujets sains et des sujets traité par l'alloxane :

A



B

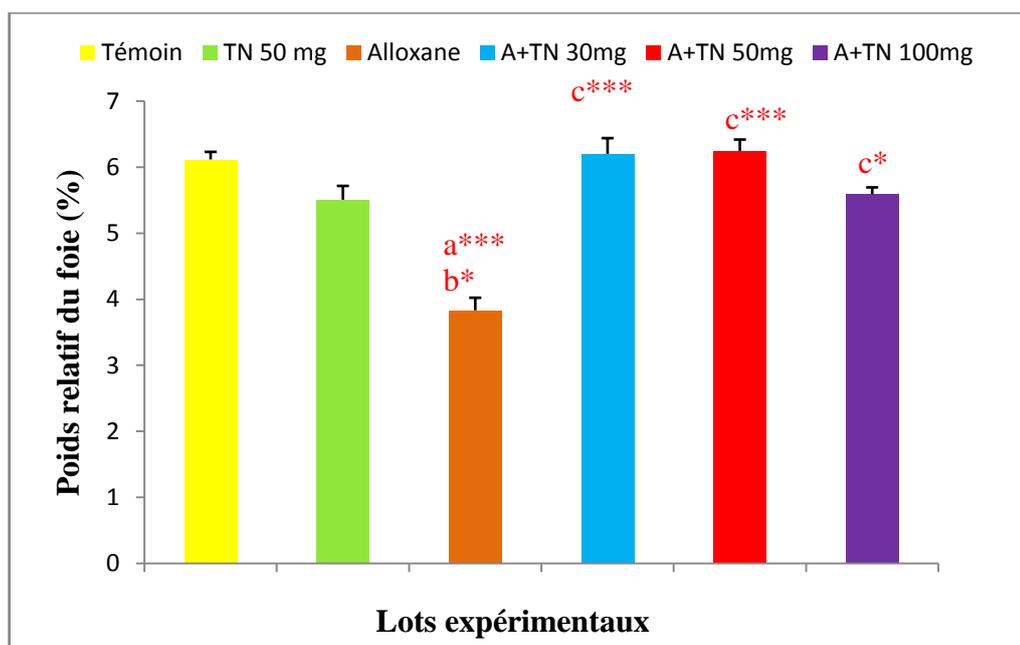


**Figure 26 :** Etude de l'évolution du poids corporel(A) et gain du poids corporel (GP) chez le lot témoin et les lots traités pendant 21 jours de traitement.

La figure 26 (A) montre toujours l'existence d'une différence significative entre le poids initial et final chez les différents lots de traitement. Mais il existe une augmentation très hautement significative ( $P \leq 0,001$ ) de la gaine du poids corporel chez les groupes traités par l'alloxane à une dose 150mg/kg (D.U) comparant au groupe témoin et les autres lots traités. De plus on observe une diminution significative ( $P \leq 0,05$ ) chez le groupe traité par l'alloxane (150mg/kg) D.U + Le TN (30mg/kg pc/j) par rapport au groupe traité par Le TN (50mg/kg pc/j) (Figure 26 B).

### A.2.Poids relatif du foie

Les résultats obtenus (Tab 26, Fig 27) montrent qu'il y a une diminution très hautement significative ( $P \leq 0,001$ ) du poids relatif du foie chez le groupe traités par l'alloxane à une dose 150mg/kg (D.U) comparé au témoin, le groupe traité par l'alloxane (150mg/kg) D.U + le TN (30mg/kg pc/j), le groupe traité par l'alloxane (150mg/kg) D.U + le TN (50mg/kg pc/j) et le groupe traité par l'alloxane (150mg/kg) D.U + Le TN (100mg/kg pc/j). De plus on observe une diminution significative ( $P \leq 0,05$ ) du poids relatif du foie chez le groupe alloxanique par rapport au groupe traité par Le TN (50mg/kg pc/j).



**Figure 27:** Evolution du poids relatif du foie (%) chez le lot témoin et les lots traités pendant 21 jours de traitement.

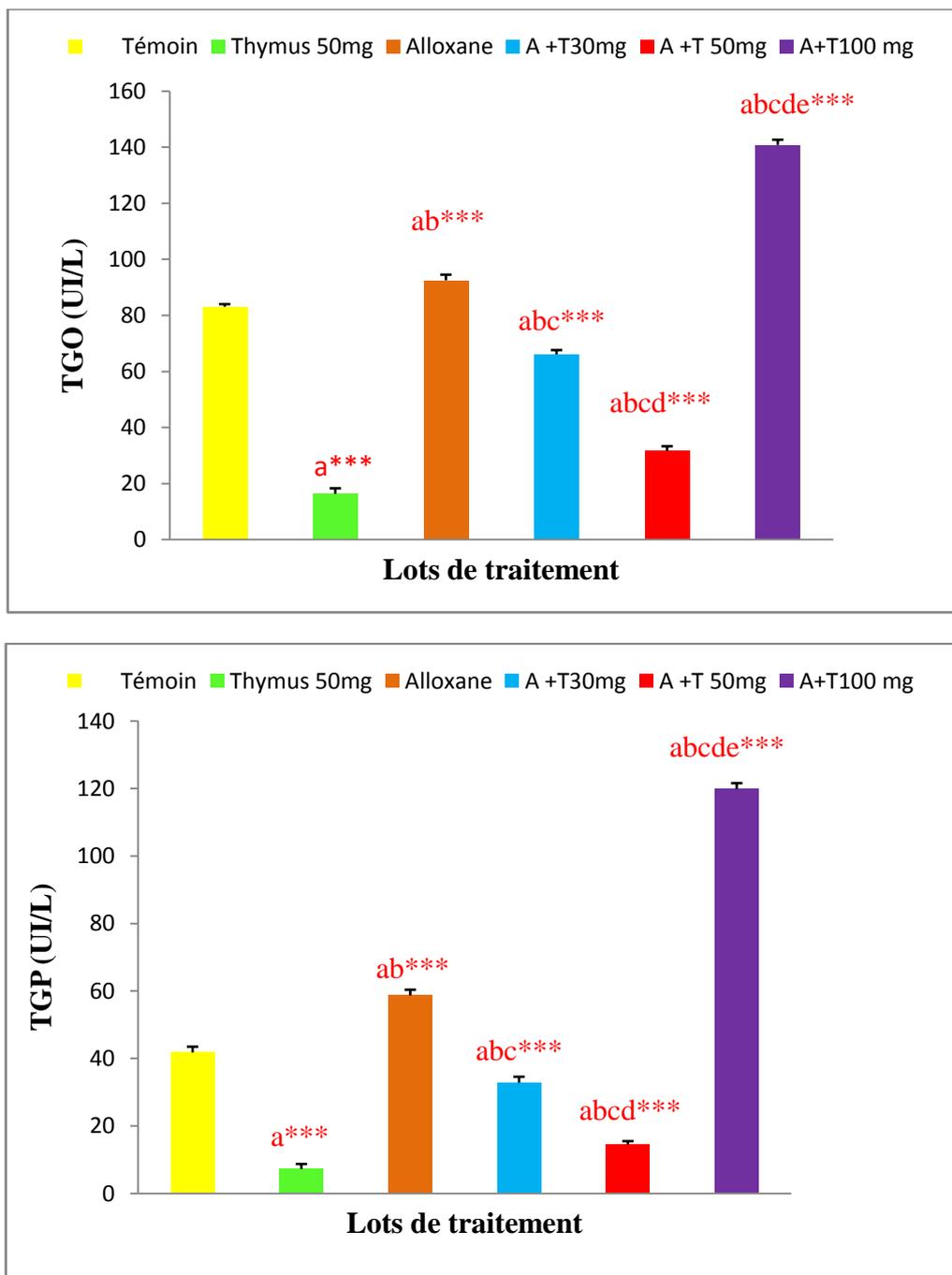
## B. Etude des paramètres biochimiques sanguins

**Tableau 07** : variation de l'activité enzymatique des transaminases et de la phosphatase alcaline sérique chez les lots témoin et les lots traités après 21 jours de traitement.

Paramètre	Lots expérimentaux					
	Témoins (n=7)	TN 50mg (n=7)	Alloxane (n=7)	A+TN 30mg (n=7)	A+TN 50 mg (n=7)	A+TN 100mg (n=7)
<b>TGO (U/L)</b>	83.12± 0.917	16.29± 1.98 <sup>a***</sup>	92.55± 1.996 <sup>ab***</sup>	66.08± 1.54 <sup>abc***</sup>	31.63± 1.64 <sup>abcd***</sup>	140.86± 1.86 <sup>abcde***</sup>
<b>TGP (U/L)</b>	41.85± 1.68	7.29± 1.5 <sup>a***</sup>	58.72± 1.71 <sup>ab***</sup>	32.86± 1.77 <sup>abc***</sup>	14.57± 0.98 <sup>abcd***</sup>	119.84± 1.78 <sup>abcde***</sup>
<b>P Alc (U/L)</b>	114.71± 4.82	112.57± 3.87	178.31± 4.44 <sup>ab***</sup>	118.14± 3.58 <sup>c*** ab*</sup>	117.04± 3.82 <sup>c*** b**</sup>	183.14± 1.68 <sup>abde*** c*</sup>

### B.1. Transaminases

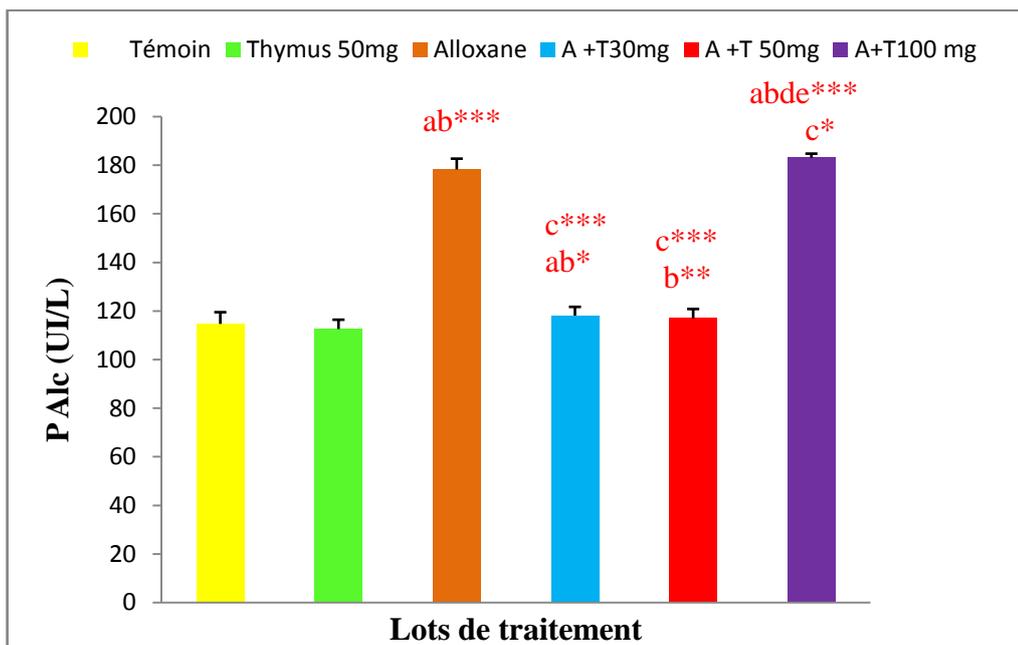
Les résultats obtenus (Tab 07, Fig 28) révèlent une diminution de l'activité des transaminases (TGO, TGP) avec une différence très hautement significative ( $p \leq 0.001$ ) chez A+TN 50 mg/kg/j et A+TN 30 mg/kg/j comparés aux témoins et les autres lots traités.



**Figure 28 :** L'évaluation de l'activité enzymatique des transaminases sériques chez les souris témoins et traités après 21 jours de traitement, a : comparaison avec le lot Témoin, b : comparaison avec le lot traité par le thymus, c : comparaison avec le lot traité par le alloxane D.U, d : comparaison avec la combinaison A+TN 30 mg/kg/j, e : comparaison avec la combinaison A+TN 50 mg/kg/j, P : Seuil de signification (\* : $p \leq 0.05$ , \*\* : $p \leq 0.01$ , \*\*\* : $p \leq 0.001$ ).

## B.2.Phosphatase alcaline

Nos résultats montrent une diminution de la phosphatase alcaline sérique avec une différence très hautement significative ( $p \leq 0.001$ ) chez le lot A+TN 50 mg/kg/j et le lot A+TN 30mg/kg/j par rapport aux A+TN 100 mg/kg/j et le lot Alloxanique et hautement significative ( $p \leq 0.01$ ) chez le lot A+TN 50 mg/kg/j par rapport au lot *Thymus* 50 mg/kg/j et aucune signification avec le témoin, et significative ( $p \leq 0.05$ ) chez A+TN 30 mg/kg/j par rapport au Témoin et *Thymus* 50 mg/kg/j (Tab 07, Fig 29).



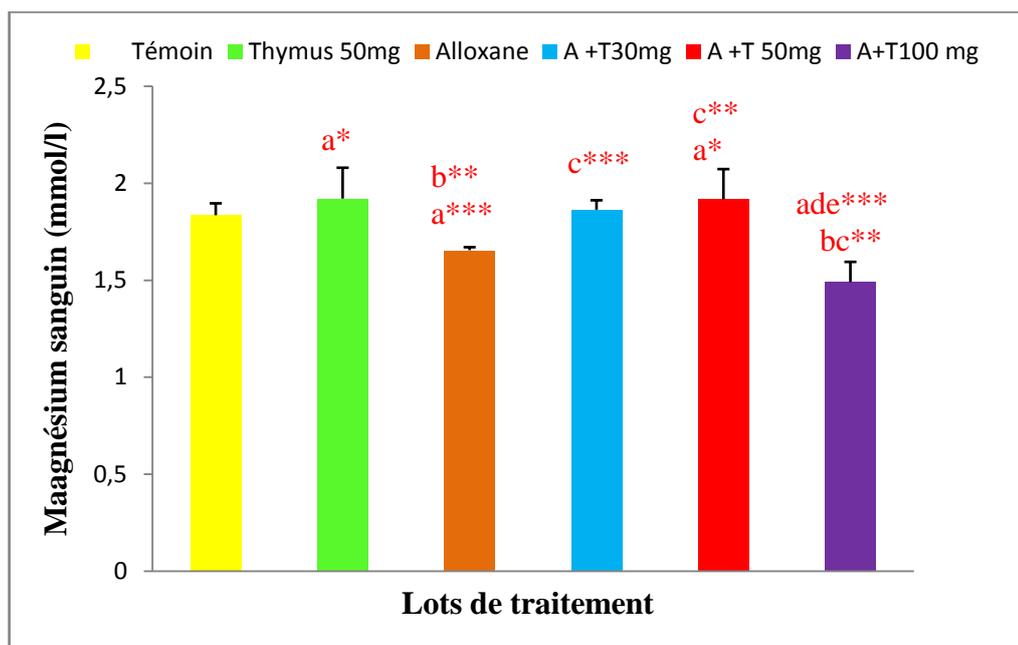
**Figure 29 :** L'évaluation de l'activité enzymatique de la phosphatase alcaline sérique chez les souris témoins et traités après 21 jours, a : comparaison avec le lot Témoin, b : comparaison avec le lot traité par le thymus, c : comparaison avec le lot traité par le alloxane D.U, d : comparaison avec la combinaison A+TN 30 mg/kg/j, e : comparaison avec la combinaison A+TN 50 mg/kg/j, P : Seuil de signification (\* :  $p \leq 0.05$ , \*\* :  $p \leq 0.01$ , \*\*\* :  $p \leq 0.001$ ).

## B.3.Magnésium

**Tableau 08** : variation de la magnésémie chez les lots témoin et les lots traités après 21 jours de traitement.

Paramètre	Lots expérimentaux					
	Témoins (n=7)	TN 50mg (n=7)	Alloxane (n=7)	A+TN30g (n=7)	A+TN 50 mg (n=7)	A+TN100mg (n=7)
Magnésium (mmol/l)	1.83± 0.061	1.92± 0.16 <sup>a*</sup>	1.65± 0.015 <sup>a***b**</sup>	1.86± 0.049 <sup>c***</sup>	1.92± 0.16 <sup>c**a*</sup>	1.49± 0.1 <sup>ade**bc**</sup>

Nos résultats montrent une augmentation significative ( $p \leq 0.05$ ) du taux de magnésium chez le lot traité par A+TN 50 mg/kg/j comparant au lot témoin hautement significative ( $p \leq 0.01$ ) par rapport au lot Alloxanique et avec une différence très hautement significative ( $p \leq 0.001$ ) par rapport au A+TN 100 mg/kg/j (Tab 08, Fig 30).



**Figure 30** : Variation du concentration de magnésium sérique chez les souris témoins et traités après 21 jours, a : comparaison avec le lot Témoin, b : comparaison avec le lot traité par le thymus, c : comparaison avec le lot traité par le alloxane D.U, d : comparaison avec la combinaison A+TN 30 mg/kg/j, e : comparaison avec la combinaison A+TN 50 mg/kg/j, P : Seuil de signification (\* :  $p \leq 0.05$ , \*\* :  $p \leq 0.01$ , \*\*\* :  $p \leq 0.001$ ).

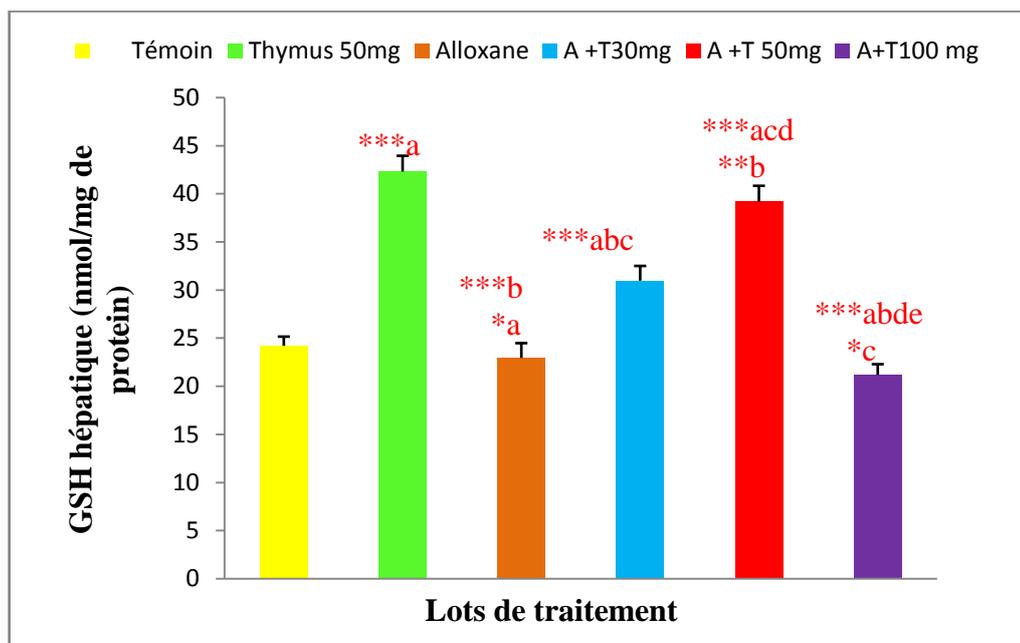
## C .Etude des paramètres biochimiques tissulaires

**Tableau 09:** Variation de la teneur hépatique en glutathion (GSH), Malon di aldéhyde (MDA), l'activité enzymatique de la glutathion peroxydase (GPx), glutathion -S- transférase (GST), catalase (CAT), chez les souris témoins et traités après 21 jours de traitement.

Paramètre	Lots expérimentaux					
	Témoins (n=7)	TN 50mg/kg/j (n=7)	Alloxane150 mg/kg/j (n=7)	A+TN 30 mg/kg/j (n=7)	A+TN 50 mg/kg/j (n=7)	A+TN100 mg/kg/j (n=7)
<b>GSH (nmol/mg de prot)</b>	24.2 ± 0.96	42.3 ± 1.64 <sup>a***</sup>	22.94 ± 1.53 <sup>b***a*</sup>	30.97 ± 1.53 <sup>abc***</sup>	39.17 ± 1.66 <sup>acd***b**</sup>	21.18 ± 1.11 <sup>***abdec*</sup>
<b>GPx(mol/ mg de prot)</b>	0.045664743 ± 0.00073	0.067052117 ± 0.00077 <sup>a***</sup>	0.03560421 ± 0.00011 <sup>b***a***</sup>	0.047602304 ± 0.00067 <sup>cb** a**</sup>	0.05580282 ± 0.00012 <sup>abcd***</sup>	0.03201061 ± 0.0018 <sup>abdec***</sup>
<b>GST (nmol/mn/ mg de prot)</b>	0.042 ± 0.0011	0.024 ± 0.0015 <sup>a***</sup>	0.048 ± 0.0011 <sup>ab***</sup>	0.036 ± 0.0013 <sup>abc**</sup>	0.026 ± 0.0015 <sup>acd***b**</sup>	0.055 ± 0.0015 <sup>abdec***</sup>
<b>CAT (mol/min /mg de prot)</b>	28.66 ± 1.39	45.09 ± 1.84 <sup>a***</sup>	24.58 ± 1.39 <sup>b***a**</sup>	34.45 ± 1.94 <sup>abc***</sup>	35.57 ± 1.99 <sup>abcd***</sup>	22.76 ± 1.1 <sup>abde***c*</sup>
<b>MDA (nmol/mg de prot)</b>	0.11 ± 0.0028	0.08 ± 0.0048 <sup>a***</sup>	0.12 ± 0.0034 <sup>ab***</sup>	0.097 ± 0.004 <sup>abc***</sup>	0.084 ± 0.0032 <sup>acd***b**</sup>	0.13 ± 0.0043 <sup>abde***c*</sup>

### C.1. Glutathion réduit (GSH)

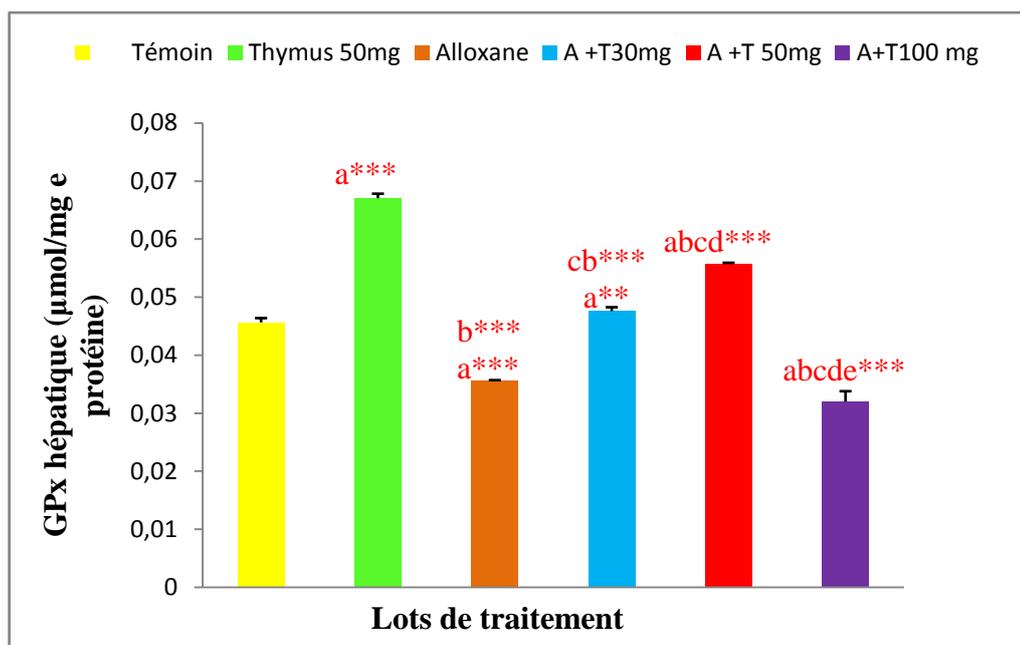
Les résultats obtenus (Tab 09, Fig 31) montrent une augmentation de la teneur hépatique en glutathion avec une différence très hautement significative ( $p \leq 0.001$ ), chez le lot A+TN 50 mg/kg/j et A+TN 30 mg/kg/j par rapport au lot témoin, Alloxanique, A+TN 100 mg/kg/j et avec une différence hautement significative ( $p \leq 0.01$ ), chez le lot A+TN 50 mg/kg/j par rapport au lot TN 50mg/kg/j.



**Figure 31 :** Variation de la teneur hépatique en glutathion réduit (nmol/mg de protéine) chez les souris témoins et traités après 21 jours, a : comparaison avec le lot Témoin, b : comparaison avec le lot traité par le thymus, c : comparaison avec le lot traité par le alloxane D.U, d : comparaison avec la combinaison A+TN 30 mg/kg/j, e : comparaison avec la combinaison A+TN 50 mg/kg/j, P : Seuil de signification (\* :  $p \leq 0.05$ , \*\* :  $p \leq 0.01$ , \*\*\* :  $p \leq 0.001$ ).

### C.2. Glutathion peroxydase (GPx)

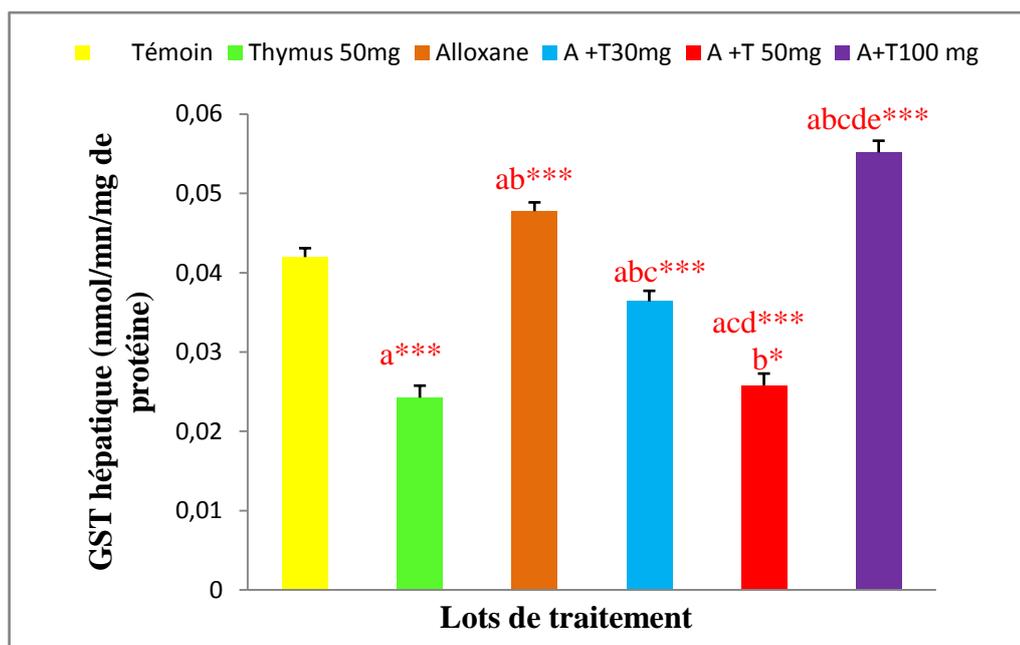
L'activité enzymatique de la glutathion peroxydase (GPx) hépatique est augmentée chez le lot A+TN 50 mg/kg/j avec une différence très hautement significative ( $p \leq 0.001$ ) par rapport au témoin et aux autres lots traités et la même chose pour le lot A+TN 30 mg/kg/j sauf par rapport au lot témoin il présente une différence hautement significative ( $p \leq 0.01$ ) (Tab 09, Fig 32).



**Figure 32** Variation de l'activité enzymatique de la glutathion peroxydase dans le foie chez les souris témoins et traités après 21 jours, a : comparaison avec le lot Témoin, b : comparaison avec le lot traité par le thymus, c : comparaison avec le lot traité par le alloxane D.U, d : comparaison avec la combinaison A+TN 30 mg/kg/j, e : comparaison avec la combinaison A+TN 50 mg/kg/j, P : Seuil de signification (\* : $p \leq 0.05$ , \*\* : $p \leq 0.01$ , \*\*\* : $p \leq 0.001$ ).

### C.3. Glutathion - S- transférase (GST)

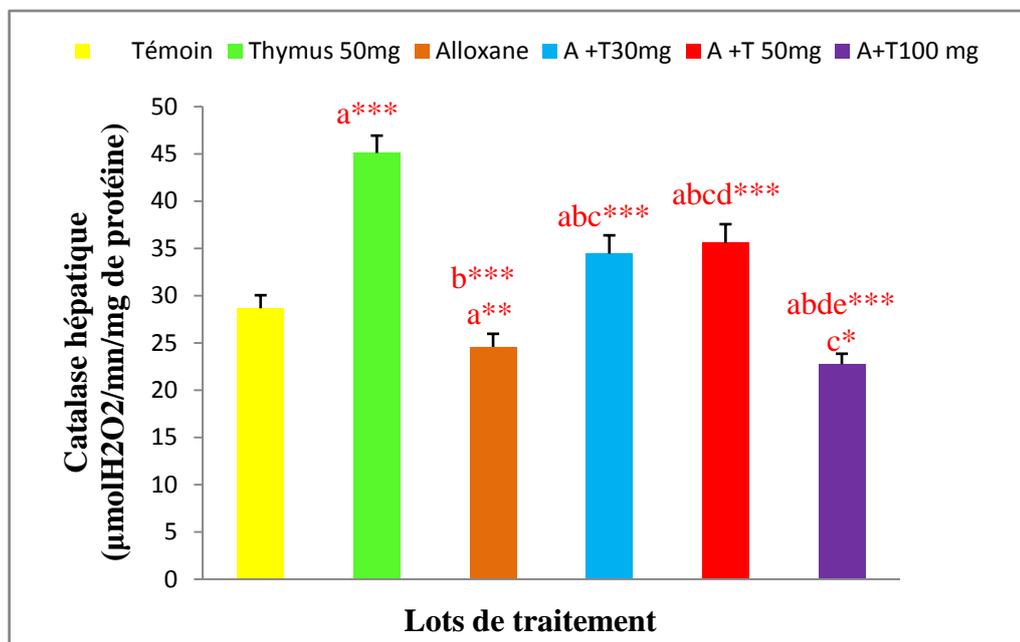
Une diminution de l'activité enzymatique de la glutathion-S- transférase (GST) hépatique chez le lot A+TN 50mg/kg/j avec une différence très hautement significative ( $p \leq 0.001$ ) par rapport au témoin et au autre lot traité sauf comparant au TN 50mg/kg/j présente et une différence significative ( $p \leq 0.05$ ), et chez le lot A+TN 30mg/kg/j présente une différence très hautement significative ( $p \leq 0.001$ ) par rapport au témoin et autres lots traités (Tab 09, Fig 33).



**Figure 33:** variation de l'activité enzymatique de la glutathion -S- transférase (nmol/mg de protéines) chez les souris témoins et traités après 21 jours, a : comparaison avec le lot Témoin, b : comparaison avec le lot traité par le thymus, c : comparaison avec le lot traité par le alloxane D.U, d : comparaison avec la combinaison A+TN 30mg/kg/j, e : comparaison avec la combinaison A+TN 50 mg/kg/j, P : Seuil de signification (\* : $p \leq 0.05$ , \*\* : $p \leq 0.01$ , \*\*\* : $p \leq 0.001$ ).

### C.4. Catalase (CAT)

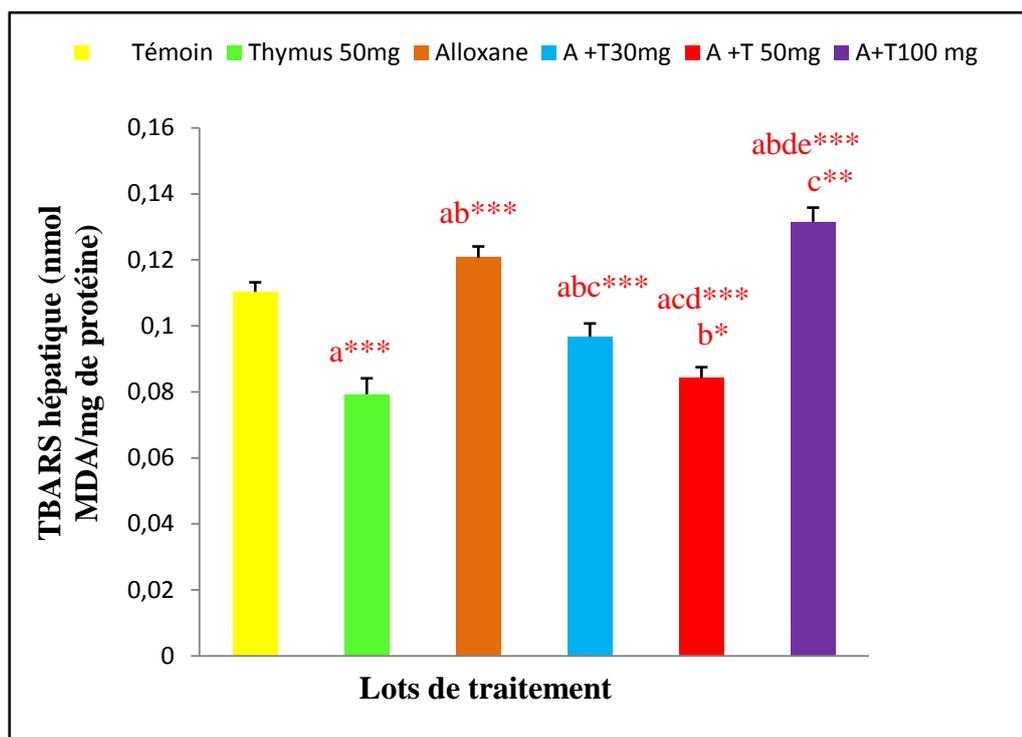
Nos résultats (Tab 09, Fig 34) montrent une diminution de l'activité enzymatique de la catalase hépatique chez le lot A+TN 50 mg/kg/j et A+TN 30 mg/kg/j avec une différence très hautement significative ( $p \leq 0.001$ ) par rapport au lot témoin et aux autres lots traités.



**Figure 34 :** Variation de l'activité du catalase ( $\mu\text{mol} / \text{min} / \text{mg}$  prot) dans le foie chez les souris témoins et traités après 21 jours de traitement, a : comparaison avec le lot Témoin, b : comparaison avec le lot traité par le thymus, c : comparaison avec le lot traité par le alloxane D.U, d : comparaison avec la combinaison A+TN 30 mg/kg/j, e : comparaison avec la combinaison A+TN 50 mg/kg/j, P : Seuil de signification (\* :  $p \leq 0.05$ , \*\* :  $p \leq 0.01$ , \*\*\* :  $p \leq 0.001$ ).

### C.5. Malondialdéhyde (MDA)

D'après les résultats obtenus (Tab 09, Fig 35) on observe une diminution avec une différence très hautement significative ( $p \leq 0.001$ ) du taux de MDA dans les organes foie chez lot A+TN 50 mg/kg/j par rapport au lot témoin et les autres lots traités sauf par rapport au lot TN 50 mg/kg/j port le lot A+TN 50 mg/kg/j une différence significative ( $p \leq 0.05$ ) et diminution avec une différence très hautement significative ( $p \leq 0.001$ ) chez le lot A+TN 30 mg/kg/j par rapport au témoin et aux autres lots traités.



**Figure 35 :** Variation du malondialdéhyde (nmol/mg de prot) dans le foie chez les souris témoins et traités après 21 jours de traitement, a : comparaison avec le lot Témoin, b : comparaison avec le lot traité par le thymus, c : comparaison avec le lot traité par le alloxane D.U, d : comparaison avec la combinaison A+TN 30 mg/kg/j, e : comparaison avec la combinaison A+TN 50 mg/kg/j, P : Seuil de signification (\* : $p \leq 0.05$ , \*\* : $p \leq 0.01$ , \*\*\* : $p \leq 0.001$ )

# Discussion

En toxicologie, la majorité des recherches ne concernaient que l'investigation des effets toxiques des xénobiotiques, tandis que les mécanismes et les agents de détoxification et de neutralisation n'ont pas encore pris leur valeur comme des objectifs des études expérimentales. C'est pour cela, dans ce travail, nous sommes intéressés, en premier lieu, à la mise en évidence d'un éventuel effet du *Thymus numidicus* sur la toxicité hépatique induite par l'alloxane, sur quelques paramètres biochimiques plus spécifiquement le bilan hépatique et du stress oxydant chez la souris.

L'Alloxane est un agent oxydant fort exerce une activité cytotoxique sur les cellules  $\beta$  par le produit de sa réduction, l'acide diallurique (**Grankvist et al., 1981**). Il établit un cycle d'oxydoréduction avec formation de radicaux superoxydes, et donc modifie la balance entre les radicaux libres générés et les systèmes antioxydants, et altère l'équilibre pro-oxydant/antioxydant, conduisant à un stress oxydant (**Sharma et al., 2000**).

Le stress oxydant qui résulte d'un déséquilibre entre la production des RL et leur élimination par les défenses anti oxydantes, contribue à l'initiation et à la progression de plusieurs maladies. Les RL sont très réactifs et peuvent attaquer, s'ils ne sont pas détruits, différentes cibles telles que les protéines, l'ADN et surtout les acides gras poly insaturés (peroxydation lipidique) (**Bonnefont-Rousselot et al., 2000 ; Sharma et al., 2000**).

#### **A. Effet du *Thymus numidicus* sur le poids corporel et le poids relatif du foie**

D'après les résultats obtenus, nous avons enregistré une augmentation très hautement significative du poids corporel des souris traitées par l'alloxane par rapport aux témoins, Cet effet peut être dû à l'augmentation de l'anabolisme, plus particulièrement des lipides. Ces résultats sont similaires à ceux publiés par une l'étude de (**Zidi Sourour, 2009**) réalisée sur les rats.

En revanche, le traitement des souris par la combinaison A+TN (50mg/kg pc/j) a diminué le poids corporel jusqu'à la normalité, cette diminution est due à l'effet protecteur du *Thymus numidicus* riche en flavonoïdes, contre les effets oxydants de l'alloxane ce qui est en accord avec le résultat obtenu par (**Zidi Sourour, 2009**).

En ce qui concerne l'effet sur le poids relatif du foie, nous avons remarqué une diminution hautement significative. Cette diminution du poids relatif probablement due à une dégradation des cellules hépatiques, en forme des îlots de nécrose et dégénérescence graisseuse de la cellule hépatique, Ces signes de dégénérescence apparaissent très rapidement, quelques heures après une seule injection d'alloxane, ce qui est en accord avec les travaux de (**Anne marie, 1954**) sur le foie de cobaye.

Le traitement des souris alloxaniques par le *Thymus numidicus* (50mg/kg pc/j) a entraîné une amélioration du poids relatif du foie, cette amélioration est due à l'effet protecteur du *Thymus*

*numidicus* contre les effets indésirables de l'alloxane. Ceci est confirmé par les travaux de (**Zidi Sourour, 2009**).

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

Le foie est le principal organe de détoxification, il est capable de neutraliser toutes les substances toxiques. Vu son rôle dans la transformation des xénobiotiques à titre d'exemple l'alloxane, où le foie présente un grand risque de dommages.

Nos résultats révèlent une augmentation de l'activité enzymatique de TGO, TGP et de la PAL chez les souris traitées par l'alloxane (150mg/kg) par rapport aux témoins. L'augmentation de l'activité des enzymes hépatiques sériques est expliquée par la destruction des cellules hépatiques (cytolysse hépatique) par les substances toxiques (effet hépato toxique de l'alloxane) (**Barbosa, 2006. Michailova, 1998**).

En outre, les TGO, TGP, et La PAL sont les biomarqueurs les plus sensibles, directement impliqués dans l'étendue des dommages cellulaires et de la toxicité, car ils sont cytoplasmiques et libérés dans la circulation après l'atteinte cellulaire (**Anderson, 1993**), après le traitement par le *Thymus numidicus* pendant 21 jours ,on marque une diminution des transaminases (TGO,TGP) avec une différence très hautement significative ( $p \leq 0.001$ ) chez lot A+TN (50 mg/kg) par rapport aux témoins et aucune différence significative de l'activité enzymatique de la phosphatase alcaline n'a été observée chez le lot A+TN (50 mg/kg) comparé au témoin. Cela révèle la capacité antioxydante de la plante avec l'alloxane d'atténuer les lésions hépatiques induites par ce dernier. Ces résultats sont en accord avec les résultats de (**Byung Keun et al., 2008**).

Le magnésium se situe dans les os, également dans les muscles, les cellules et le foie, il joue un rôle crucial dans l'organisme en permettant la régularisation du rythme cardiaque, le fonctionnement des muscles et la transmission de l'influx nerveux et aussi entre comme un cofacteur à l'activité enzymatique. Nos résultats montrent une diminution de la concentration sérique du magnésium avec une différence très hautement significative ( $p \leq 0.001$ ) chez le lot traité par l'alloxane par rapport au lot témoin, et après un traitement par la plante *Thymus numidicus* on constate une augmentation de taux du magnésium avec une différence significative ( $p \leq 0.05$ ) chez le lot traité par A+T 50 mg comparant au lot témoin. Cette baisse de la magnésémie est dû à une diminution de la réabsorption tubulaire et aussi à l'activité enzymatique (cofacteur) (**Bernard, 1985**).

### C. Effet du *thymus numidicus* sur les paramètres du stress oxydant

Le stress oxydant dans les cellules ou les tissus se réfère à renforcer la production d'espèces réactives de l'oxygène et/ou la déplétion dans le système de défense antioxydant, les ERO générés dans les tissus sont efficacement piégés par le système enzymatique antioxydant comme la GPx, catalase et, ainsi que les antioxydants non enzymatiques comme le GSH (Schlorff *et al.*, 1999). Le glutathion agit comme un antioxydant physiologique de protection dans des systèmes biologiques (Fatima et Mahmood, 2007). Il joue son rôle antioxydant également en synergie avec les enzymes antioxydantes telles la glutathion peroxydase, la catalase et la superoxyde desmutase (Morin *et al.*, 2001). Pour la protection le GSH porte une fonction thiol qui constitue un système antioxydant de la première défense en se liant par sa fonction SH aux métabolites toxiques (Morin *et al.*, 2001).

Au cours de notre étude, nos résultats montrent une diminution significative ( $p \leq 0.05$ ) du taux de glutathion réduit (GSH) dans le tissu hépatique chez le lot traité par l'alloxane par rapport au témoin 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 ce résultat a été confirmé par (Lopez-Lazaro *et al.*, 2000. Vessal *et al.*, 1992).

Cependant, le traitement des souris par le *Thymus numidicus* a empêché la diminution de GSH avec une différence très hautement significative ( $p \leq 0.001$ ), chez le lot A+TN (50 mg/kg) par rapport au témoin, celle-ci est expliquée par sa effet scavengeur, c'est-à-dire au lieu que les radicaux libres produits par l'alloxane se neutralisent par le GSH ils vont plutôt être captés par les composés phénoliques en maintenant ainsi le taux normal de glutathion des cellules hépatiques ce qui en accord avec les travaux de (Quinlan *et Gutteridge*, 1988. Huk *et al.*, 1998). Des études scientifiques montrée l'effet antiradicalaire des flavonoïdes contre la peroxydation lipidique, et donc de la formation des radicaux libres chez les souris alloxaniques (El-Missiry *et al.*, 2000).

Les espèces réactives de l'oxygène sont susceptibles d'épuiser l'activité des systèmes enzymatiques antioxydants de la cellule (GPx, CAT...), qui apparaitre d'après nos résultats chez les souris alloxaniques porte une différence très hautement significative ( $p \leq 0.001$ ) par rapport au lot témoin, donc il va aboutisse finalement à un déséquilibre du système redox cellulaire au profit des prooxydants. Cet état de stress oxydatif favorise les réactions en cascade des radicaux libres avec les molécules biologiques. Une lipoperoxydation (au niveau des biomembranes cellulaires).

Au cours de notre étude nos résultats montrent que le *Thymus numidicus* (50 mg /kg) administré en association avec l'alloxane présente une différence très hautement significative ( $p \leq 0.001$ ) par rapport au témoin, ont maintenu l'équilibre de la balance antioxydant/ prooxydant des

cellules hépatique. Cet équilibre est maintenu sous l'effet de l'action antioxydant de la plante *Thymus numidicus* contre les RL. Les systèmes enzymatiques de défense antioxydants (GPx, CAT) ne sont pas donc altérés et le taux cellulaire du GSH est conservé sous l'effet chimoprotecteur des composés antioxydant de la plante. Cette résultat d'accord avec les travaux (**Veerapur et al., 2010**), (**Koumar et al., 2009**), (**Shanmugasundaram et al., 2011**) pratiquée sur des souris alloxaniques.

Concernant la glutathion S-transférase (GST), cette enzyme joue un rôle important dans la désintoxication des xénobiotiques et/ou dans la protection contre des métabolites nocifs (enzyme de la phase 2 du conjugaison) générés après la dégradation des macromolécules suite à leur exposition au stress oxydant (**Mulder et al., 1999**). D'après nos résultats on observe une augmentation très hautement significative de la GST dans le foie chez le lot alloxanique par rapport aux témoins. L'augmentation de l'activité de cette enzyme est une réponse physiologique (effet protecteur) pour compenser les altérations qui sont dus aux radicaux libres (**Moussa, 2008**). Après le traitement par la plante *Thymus numidicus* pendant 21 jours, l'activité enzymatique de la GST, revient presque à la normale chez le lot A+TN (50 mg/kg). Ceci est dû à l'effet protecteur de cette plante contre les dommages oxydatifs induits par l'alloxane. Ce résultat est confirmé par d'autres études (**Moussa, 2008**, **Lorenzy et Oates, 2005**, **Kassab, 2003**).

Du fait de la difficulté de la mesure des radicaux libres (réactivité intense, demi-vie extrêmement courte, très faible concentration); des marqueurs indirects sont déterminés. Ces marqueurs sont les produits secondaires de la peroxydation lipidique. Il s'agit de substances réagissant avec l'acide thiobarbiturique (TBARS) (**Goudable et Favier, 1997**).

Au cours de notre travail nous avons enregistré une augmentation très hautement significative ( $p \leq 0.001$ ) du taux de MDA dans le foie, chez les souris alloxaniques par rapport aux témoins. Le traitement par le *Thymus numidicus* à diminuer significativement le taux de l'MDA dans le tissu hépatique.

Alors l'hyperperoxydation pourrait être le résultat d'une modification importante du statut redox cellulaire dans le foie en faveur des prooxydants, car l'alloxane s'est avéré générateur de radicaux libres qui est par leur pouvoir oxydant, sont à l'origine de l'oxydation de l'ADN, de lipides aboutissant ainsi à la mort des cellules  $\beta$  et l'installation du diabète (**Quinlan et Gutteridge, 1988** ; **Huk et al., 1998**). Ces résultats sont confirmés par l'étude de (**Kebieche Mohamed, 2009**).

# **Conclusion & Perspectives**

De nos jours, l'utilisation des plantes médicinales en phytothérapie a reçu un grand intérêt dans la recherche biomédicale et devient aussi importante. Cet intérêt de ces plantes médicinales représentent d'une part une source inépuisable de substances et de composés naturels bioactifs et d'autre part du besoin de la recherche d'une meilleure médication par une thérapie plus douce sans effets secondaires. Les liqueurs naturelles issues des plantes contiennent une variété de composés phénoliques et des huiles essentielles auxquelles on peut attribuer un pouvoir antioxydants.

Au cours de notre travail nous avons utilisé l'alloxane comme générateur des radicaux libres ce qu'il va nous permis d'évaluer l'effet de la plante *Thymus numidicus* a ce fait on a marquée une augmentation des transaminases qui sont des biomarqueurs d'une cytolysse hépatique et on a marquée une déplétion en GSH qui conduit à une réduction de l'activité des enzymes antioxydantes (GPx, CAT) ce qu'il va augmente le taux de la peroxydation lipidique.

Notre travail, s'est intéressé aux effets antioxydants de la liqueur des feuilles de *Thymus nemudicus* plantes largement utilisées en médecine traditionnelle à travers le monde et sur tout en Algérie, le constat d'effet antioxydant de cette plante tirée par l'étude importée sur Les marqueurs du stress oxydatifs. Ces derniers permis de mis en évidence une augmentation importante de l'activité de la CAT et GPx et en teneur du GSH hépatique, et réduction significative dans le taux de transaminase et a l'activité de GST et la dose la plus thérapeutique marquée chez le groupe alloxanique traité par la dose 50 mg/kg /j de la liqueur du *Thymus numidicus* (injection intra-péritonéal) donc cette plante joue un rôle chémoprotecteur Contre l'hépatotoxicité induit par l'alloxane la dose 50 mg/kg/j par contre la combinaison la dose 100 mg/kg elle potentialise la toxicité, donc d'après nos résultat on peut disposer la dose 50 mg/kg/j du liqueurs des feuilles de la plante thymus nemudicus comme un model thérapeutique pour prévenir l'hépatotoxicité et d'autre complication liée au stress oxydatif.

En perspectives, il serait intéressant de développer cette recherche de point de vue opérationnel par approfondissement de la connaissance sur :

- Etude histologie et immunohistochimique du foie.
- Dosage d'autres paramètres de la défense antioxydant : SOD, le rapport GSH/GSSG.
- Utilisée la dose 50 mg/kg/j comme une dose typique dans les médicaments supplémentaire pour éviter les effets secondaires sur l'hépatotoxicité d'un autre médicament.

# **Références Bibliographiques**

1. **Aebi.1984.** Catalase, methods in enzymology. In: L. Packer (Ed).*Academic pres, Orlando.* 105: 121-125.
2. **Alain M. 2011.** Supplémentation en oméga 3 et antioxydant et stress oxydant au cours d'un entraînement de Judo. Thèse de doctorat. *Université d'Orléans.* France.163 pages.
3. **Alberts B. et al., 2009.** Essential Cell Biology. *Bernard Garland.* 30: 860 -361.
4. **Anderson H., Stitt A. 1993.** Induction of alloxan/streptozotocin diabetes in dogs a revised experimental technique. *Lab Anim.* 27: 281-285.
5. **Anisio F.2005.** Effets du stress oxydant sur le fonctionnement des Adipocytes : Adiponectine et prostaglandines. Thèse de doctorat. *Université national des sciences Appliquée de Lyon.* Lyon. 133 pages.
6. **Ankur R et Shahjad A.2012.** Alloxan induced diabetes: mechanism and effects. *International journal of research in pharmaceutical and biomedical sciences.* 3: 819-823.
7. **Anne M. 1954.** Actions de l'intoxication alloxanique sur le foie de cobaye. institut d'histologie et d'embryologie de l'université de genève. *Anim.* 22: 2841-2842.
8. **Ballatori N., krance S., Notenboom S., Shi S.,Tieuk M., Hammond C. 2009.**Gluthione dysregulation and the etiology and progression of humain diseases. P: 191-195.
9. **Barbosa N., B V., Rocha J., B T., Wandracek. D., C Perottoni., Zeni G., Nogueira W. 2006.** Diphenyl diselenide reduces temporarily hyperglycemia possible relationship with oxidative stress. *Chemico-Biological Interactions.* 163: 230-238.
10. **Barouki R. 2006.** Stress oxydant et vieillissement. *M/S.* 20: 266-272.
11. **Bazylko A et Strzelecka H. 2007.** *Fitoterapia* 78 : 391-395.
12. **Belkheiri N. 2010** .Dérivés phénoliques à activité antiathérogènes .Thèse de 3<sup>ème</sup> cycle. *Université de Paul Sabatier.* Toulouse, France, 244 pages.
13. **Benkinouar R., Touil A., Zaidi F., Rhouati S., Chosson E., Seguin E et al. 2010.** *J.Soc Alger Chim* 20(1) :11-15.
14. **Beyer RE.1990.**The participation of coenzyme Q in free radical production and antioxidation. *Free Radic Biol Med* 8: 555–565.

15. **Blandine G. 2006.** Le stress oxydant induit par voie métabolique (régimes alimentaires) ou par voie gazeuse (hyperoxie) et effet de la Glisodin, Thèse de doctorat, Université Joseph Fourier, France. 159 pages.
16. **Bonnefont R., D., Bastard P., Jaudon M., Delallo J. 2000.** Consequences of the diabetic status on the oxidant/ anti-oxidant balance. *Diabetes and metabolism.* 26: 163-176.
17. **Bonnefontelattre J., Durand G., Jardillier J. 2003.** Biochimie pathologique: aspects moléculaires et cellulaires. Médecine-sciences Flammarion Paris. 30: 59-81.
18. **Bonnefont-Rousselot D., Therond P., Delattre J. 2003.** Radicaux libres et antioxydants. P : 65.
19. **Borg K., Tjalve H. 1988.** Effects of thiram and dithiocarbamates pesticides on the gastrointestinal absorption and distribution of nickel in mice. Pp: 87-89.
20. **Bors W., Heller W., Michel C., Satan M. 1990.** Flavonoids as antioxidants: determination of radical scavenging- efficiencies, *Methods in Enzymology* 186: 343–349.
21. **Bradford M. 1976.** A rapid and sensitive method for the quantities of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein binding, *Anal. Biochem* 72:248–254.
22. **ByungKeun Y., GukNam K., YongIae J., Hun J., Pradeep M., chihyun S. 2008.** Hypoglycemic effects of exo-biopolymers produced by Five Different medicinal mushrooms in STZ-induced diabetic Kat-the Kream. *society of mycology.* 36: 45-49.
23. **Cadet J., Bellon S., Berger M., Bourdat G., Douki T., Duarte V., Frelon S., et al 2002.** Recent aspects of oxidative DNA damage : guanine lesions, measurement and substrate specificity of DNA repair glycosylases. *Biol Chem.* 383: 933-943.
24. **Casagrande S., Bonetto V., Fratelli M., Gianazza E., Eberini I., Massigna T., Salmona M., Chang G., Holmgren A., Ghezzi P. 2000.** Glutathiolation of human thioredoxin: a possible crosstalk between the glutathione and thioredoxin systems. *Cell Mol Biol.* 16: 162-170.
25. **Cooke S., Olinski R., Evans M. 2006.** Does measurement of oxidative damage to DNA have a clinical significance? *Clin Chim Acta.* 365: 30-49.
26. **Cowan M M. 1999.** *Clinical microbiology reviews* 12: 568-570.
27. **Cracowski J., Stanke-Labesque F., Souvignet C., Bessard G. 2000.** Isoprostanes, nouveaux marqueurs du stress oxydant en pathologie humaine. *Presse Med.* 29: 604-610.

28. **Cummings C., Andon L., Haynes P., Park M., Fischer H., Schubert D. 2004.** Protein disulfide bond formation in the cytoplasm during oxidative stress. *J Biol Chem.* 279: 21749-21758.
29. **Dalle-Donne I., Rossi R., Giustarini D., Colombo R., Milzani A. 2003.** Actin Sglutathionylation:evidence against a thiol-disulphide exchange mechanism. *Free Radic Biol Med* 35:1186–1193.
30. **Davermann D., Martinez M., McKoy J., Patel N., Averbeck D., Moore CW. 2002.** Impaired mitochondrial function protects against free radical-mediated cell death. *Free Radic Biol Med* 33(9) : 09-12.
31. **Davies K. 1987.** Protein damage and degradation by oxygen radicals. *I- General aspects. J Biol Chem.* 26 : 9895-9901.
32. **Davies M., Fu S., Wang H., Dean., R. 1999.** Stable markers of oxidant damage to proteins and their application in the study of human disease. *Free Radic Biol Med.* 27: 1151-1163.
33. **Deby-dupont G., Deby C., Lamy M. 2002.** Données actuelles sur la toxicité de l’oxygène. *Réanimation.* 11: 28-39.
34. **Delattre jacques., et al. 2003.** Biochimie pathologique des Aspects moléculaire et cellulaire. P:61.
35. **Del-Corso A., Vilardo PG., Cappiello M., Cecconi I., Dal-Monte M., Barsacchi D., et al .2002.** Physiological thiols as promoters of glutathione oxidation and modifying agents in protein S-thiolation. *Arch Biochem Biophys* 397: 392–398.
36. **Demple B. 1991.** Regulation of bacterial oxidative stress genes. *Annu Rev Genet.* 25: 315-337.
37. **Dibong S D., Mpondo Mpondo E., Ngoye A., Kwin M F., Betti J L. 2011.** *Journal of Applied Biosciences* 37: 2499 – 2502.
38. **Dizdaroglu M. 1991.** Chemical determination of free radical-induced damage to DNA. *Free Radic Biol Med.* 10: 225-242.
39. **Dob T., Darhmane D., Benabdelkader T., Chelghoum TC. 2006.***Int J. Aromatherapy*, **16**: 95-100.
40. **Durand G., Jardillier JC.2003.** Biochimie pathologique: aspects moléculaires et cellulaires. Paris : *Médecine-sciences Flammarion* p 70-81.
41. **El-Missiry M., El-Gindy A. 2000.** Amelioration of alloxan induced diabetes mellitus and oxidative stress in rats by oil of *Eruca sativa* seeds. *Ann Nutr Metab.* 44: 97-100.

42. **Elqaj M., Ahami A., Belghyti D. 2007.** La phytothérapie comme alternative à la résistance des parasites intestinaux aux antiparasitaires. *Journée scientifique "ressources naturelles et antibiotiques"*. Maroc. P:21-23
43. **Ernster L et Dallner G .1999.** Biochemical, physiological and medical aspects of ubiquinone function. *Biochim Biophys Acta* 1271:195–200.
44. **Esterbauer H., Gebicki J., Puhl H., Jungens G. 1992.** The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radic Biol Med* 13:341.
45. **Etuk EU. 2010.** Animals models for studying diabetes mellitus. *Agric Biol J N Am* 2: 130-134.
46. **Evans PJ et Halliwell B.1999.** Free Radicals and Hearing: Cause, Consequence, and Criteria. *Ann N Y Acad Sci* 884: 37–40.
47. **Farrel E et Kaplan A. 1984.** Magnesium. Princeton. P : 1065-1069.
48. **Fatima S., Mahmood R. 2007.** Vitamin C attenuates potassium dichromate-induced nephrotoxicity and alterations in renal brush border membrane enzymes and phosphate transport in rats. *Clin Chim Acta.* 386: 94-9.
49. **Favier A. 1997.** Le stress oxydant : intérêt de sa mise en évidence en biologie médicale et problèmes posés par le choix d'un marqueur. Pp: 9-16.
50. **Favier A. 2003.** Le stress oxydant. *L'actualité Chimique.* 24: 108-115.
51. **Flohe L et Gunzler W.1984.** Analysis of glutathione peroxidase, *Methods Enzymol.* P : 114–117.
52. **Fridovich I. 1995.** Superoxide radical and superoxide dismutase. *Annu Rev Biochem* 64: 97-112.
53. **Fusco D., Colloca G., Lo-Monaco MR., Cesari M.2007.** Effects of antioxidant supplementation on the aging process. *Clin Interv Aging* 2(3):77-87.
54. **Ganther H.1999.** Selenium metabolism, selenoproteins and mechanisms of cancer prevention: complexities with thioredoxin reductase. *Carcinogenesis.* P 1660-1666.
55. **Garait B. 2006.** Le stress oxydant induit par voie métabolique régime alimentaire ou par gazeux hyper oxie et effet de la GLISODI .Thèse de 3ème cycle, Université Joseph Fourier Grenoble, France. 182 pages.
56. **Gardès-Albert M., Bonnefont-Rousselot D., Abedinzadeh Z., Jore D. 2003.** Espèces réactives de l'oxygène : Comment l'oxygène peut-il devenir toxique ? *L'actualité chimique*, novembre-décembre. Pp: 91-96.
57. **Ghafourifar P., Cadenas E. 2005.** Mitochondrial nitric oxide synthase. *Trends Pharmacol Sci.* 26: 190-5.

58. **Grankvist K., Marklund SL., Taljedal B. 1981.** CuZn-superoxide dismutase, Mn-superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in pancreatic islets and other tissues in the mouse. *Biochem.* 199: 393-398.
59. **Griffith OW et Mulcahy RT.1999.**The enzymes of glutathione synthesis: gamma-glutamylcysteine synthetase. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 73: 209–215.
60. **Habig H., Pabst MJ., Jacobi WB.1974.** The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J.Biol Chem* 249:7130-7136.
61. **Halbwirth H. 2010.** *International Journal of Molecular Sciences* 11: 595-600.
62. **Halliwell B., Gutteridge J. 1986.** Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine : Some problems and concepts. *Arch. Biochem. Biophys.* Pp: 501-504.
63. **Halliwell B., Gutteridge J. 1997.** Free radicals in biology and medicine. P: 187.
64. **Halliwell B., Gutteridge J. 2007.** Free radicals in biology and medicine. 187 Pages.
65. **Ham A., Liebler C. 1995.** Vitamin E oxidation in rat liver mitochondria. *Biochemistry.* 34: 5754-5761.
66. **Hashemi M., Dostar Y., Rohani S., Saraji A., Bayat M. 2009.**Influence of Aloxanes on the Apoptosis of Pancreas B-Cells of Rat. *World Journal of Medol ; Sciences ;* 4 (2): 70-73.
67. **Hii C., Howell S. 1984.** Effects of epicatechin on rat islets of Langerhans. *Diabetes.* 33: 291–6.
68. **Houlot R.1984.**Techniques d'histopathologie et de cytopathologie. P: 19-21,225-227.
69. **Huk I., Brokovich V., Nanobashvili J., Weigel G., Neumayer C., Partika R., et al. 1998.** Bioflavonoid quercetin scavenger superoxide and increases nitric oxide concentration in ischemia-reperfusion injury an experimental study. *Brit J Surg.* 85: 1080-1085.
70. **Huk. I., Brokovich. V., Nanobashvili. J., Weigel. G., Neumayer. C., Partika. R., et al. 1998.** Bioflavonoid quercetin scavenger superoxide and increases nitric oxide concentration in ischemia-reperfusion injury an experimental study. *Brit J Surg.* 85: 1080-1085.
71. **Jean P.2012.**Etude de la capacité antioxydante en lien avec la reproduction chez l'huitre *creuse crassostre gigas.* université de Bretagne occidentale. Bretagne. 145 pages.
72. **Kale A., Gawande S., Kotwal S. 2008.** *Phytotherapy Research* 22: 567-572.

73. **Kassab. A., Laradi. S., Ferchichi. S., Omezzine. A., Chafeddine. B., Amar. H., et al. 2003.** Paramètres du stress oxydant dans le diabète de type 2. *Immuno-analyse et Biologie spécialisée*. 18: 79-85.
74. **Kebieche M. 2009.** Thèse de Doctorat, Activité biochimique des extraits flavonoïdiques de la plante *Ranunculus repens* L, effet sur le diabète expérimental et l'hépatotoxicité induite par l'Epirubicine. *Biol Med*. 38: 70-71.
75. **Kinsky N .1989.** Antioxydants function of carotenoides. *Free Rad Biol Med* 7 : 617–620.
76. **Koumar. R., Ilavarasan. T., Jayachandran. M., Decaraman. P., Aravindhan. N., Padmanabhan. V. 2009.** Phytochemicals investigation on a tropical plant, *Syzygium cumini* from Kattuppalayam, Erode District, Tamil Nadu, South India. *Pakistan journal of nutrition*. 8: 83-85.
77. **Kristal BS., Park BK., Yu BP. 1996.** 4-Hydroxynonenal is a potent inducer of the mitochondrial permeability transition. *Biol Chem* 271: 254-256.
78. **Lenzen S., Freytag S., Panten U.1988.** Inhibition of glucokinase by alloxan through interaction with SH groups in the sugar-binding site of the enzyme. *Mol Pharmacol* 34:395-400.
79. **Lenzen S., Tiedge M., Jorns A., Munday R.1996.** Alloxan derivatives as a tool for the elucidation of the mechanism of the diabetogenic action of alloxan P: 88-90.
80. **Lenzen S.2008.**The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*. P:216–220.
81. **Leopoldini M., Russo N., Toscano M. 2010.** *Food Chemistry* 125: 298-306.
82. **Levine R., William J., Stadtman E., Shacter E. 1994.** Carbonyls assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol*. 233: 346-347.
83. **Lopez-Lazaro M., Martin-Cordero C., Ayuso M. 2000.** Two new flavonol glycosides as DNA topoisomerase I poison. *Z. Naturforsch.* 55: 898-902.
84. **Lorenzy M., Oates P. 2005.** The polyol pathway and diabetic retinopathy Radicaux, libres oxygenes et antioxydants. *Nutr Clin Metabol*. 11: 115-20.
85. **Mao GO et Paznausky HJ. 1992.** Electron spins resonance study on the permeability of superoxide radicals in lipid bilayers and biological membranes. *PEBSlett* 305 (3): 3-6.
86. **Martizez-Cayuela M. 1995.** Oxygen free radicals and humen disease. *Biochimie*. 77: 147-161.

87. Mata AT., Proenc C., Ferreira AR., Serralheiro M L., Nogueira J M F., Araujo M E M. 2007. *Food Chem.* 103: 778-780.
88. McCord J., Fridovich I. 1988. Superoxide dismutase: the first twenty years. *Radic Biol Med.* 5: 363-369.
89. Mebarki N. 2010. Thèse de magistère de chimie, *Université –M’Hamed Bougara-Boumerdes.*
90. Michailova 1998. Comparative assessment of liver function in workers in the petroleum industry. *Int. Arch. Occup. Environ. Health.* 71: 46-49.
91. Migdal C., Serres M. 2011. Reactive oxygen species and oxidative stress. *Med. Sci. Paris.* 27: 405-412.
92. Mladinka P., Zatloukalova L., Filipsky T., Hrdina R. 2010. *Free Radical Biology & Medicine* 49: 963-965.
93. Moncada S. 1993. The L-arginine- nitric oxide Pathway. *Nengl. J. Med.* 329: 2002-2012.
94. Morel Y., Barouki. R. 1999. Repression of gene expression by oxidative stress. *Biochem.* 3: 481-96.
95. Morin D., Thiery H., Spedding M., Tillement J. 2001. Mitochondria as target for antiischemic drugs. *J. Physiol Pharmacol.* 13: 22-67.
96. Moussa S. 2008. Oxidative stress in diabetes mellitus. *Romanian Journal of Biophysic.* 18: 225-236.
97. Mukai K., Morimoto H., Okaiuchi Y., Nagaoka S. 1993. Kinetic study of reactions between tocopheroxyl radicals and fatty acids, *Lipids.* P753–756.
98. Mulder T., Court D., Peter W. 1999. Variability of glutathione-S-transferase in human liver and plasma. *Clin. Chem.* 45: 355-359.
99. Mullenbach G., Tabrizi A., Irvine B., Bell I., Tainer J., Halliwell A. 1988. Selenocysteine mechanism of incorporation and evolution revealed in DNAs of three glutathion peroxidases. *Protein Eng.* 2: 239-246.
100. Murray R. 1984. Alanine aminotransferase. Toronto. Princeton. P:1088-1090.
101. Murray R. 1984. Aspartate aminotransferase. Toronto. Princeton. P : 112-116.
102. Murray RL. 1984. Creatinine. Toronto. Princeton. P:1261-1266 et 418.
103. Naghibi F., Mosaddegh M., Motamed SM., Ghorbani A. 2005. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* 4(2): 63-67.
104. Neuzil J et Stocker R. 1993. Bilirubin attenuates radical-mediated damage to serum albumin. p: 281-284.

105. **Nikavar B., Mojab F., Doulat-Abadi R. 2005.** *Food chemistry* 90(4):609-611.
106. **Orsini P., Bonhomme F., Britton-Davidian J., Gerasimov S.1989.** Le complexe d'espèces du genre *Mus* en Europe Centrale et Orientale : Critères d'identification, répartition et caractéristiques écologiques. P: 86-88.
107. **Özcan M et Chalcha J C. 2004.** *Bulgarian journal of plant physiology* 30 (3-4): 68-72.
108. **Pantke U., Volk T., Schmutzler M. 1999.** Oxidized proteins as a marker of oxidative stress during coronary heart surgery. *Free Radic Biol Med.* 27: 1080-1086.
109. **Pastre J. 2005.** Intérêt de la supplementation en antioxydants dans l'alimentation des carnivores domestiques. Thèse de doctorat, Ecole nationale vétérinaire, Toulouse. Pp: 55-42.
110. **Pereverzev MO., Vygodina TV., Konstantinov AA, Skulachev VP .2003.** Cytochrome c, an ideal antioxidant. *Biochem Soc Trans* 31: 1312–1315.
111. **Petersen Shay K., Moreau RF., Smith EJ., Hagen TM .2008.** Is alpha-lipoic acid a scavenger of reactive oxygen species in vivo? Evidence for its initiation of stress signaling pathways that promote endogenous antioxidant capacity. *IUBMB Life* 60 : 362–367.
112. **Pobezhimova TP et Voinikov VK.2000.** Biochemical and physiological aspects of ubiquinone function. *Membr Cell Biol* 13: 595–602.
113. **Powers S et Jackson M .2008.** Exercise-induced oxidative stress:cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Production Augments.* pp:131: 1473-1478.
114. **Putnam C., Arvai S., Bourne Y., Tainer J. 2000.** Active and inhibited human catalase structures: ligand and NADPH binding and catalytic mechanism. *J Mol Biol.* 296: 295-309.
115. **Quinlan G., Gutteridge J. 1988.** Hydroxyradical generation by the tetracycline antibodies with free radical damage to DNA, lipids, carbohydrates carbohydrates in the presence of iron and copper salts. *Biol Med.* 5: 341-342.
116. **Rahman K.2007.** Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clin Interv Aging* 2(2) : 30–36.
117. **Rajkumar L., Govindarajulu P. 1991.** Increased degradation of dermal collagen in diabetic rats. *Indian J Exp Biol.* 29: 123-124.

118. Rhee G., Kang W., Jeong W., Chang S., Yang S. 2005. Intracellular messenger function of hydrogen peroxide and its regulation by peroxiredoxins. *Curr Opin Cell Biol.* 17: 183-189.
119. Rissanen TH., Voutilainen S., Nyyssonen K., Salonen R., Kaplan GA., Salonen JT. 2003. Serum lycopene concentrations and carotid atherosclerosis: the Kuopio Ischaemic Heart Disease Risk Factor Study. *Am J Clin Nut* 77:1-8.
120. Roberts L., Morrow, J. 2000. Measurement of the F2-isoprostanes as an index of oxidative stress in vivo. *Free Radic Biol Med.* 28: 505-513.
121. Rotruck J., Pope A., Ganther H., Swanson A., Hafemen D., Hoekstra G., 1973. Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science.* 179: 588-590.
122. Rouhier N., Gelhaye E., Sautiere P., Brun A., Laurent P., Tagu D., Gerard J. 2001. Isolation and characterization of a new peroxiredoxin from poplar sieve tubes that uses either glutaredoxin or thioredoxin as a proton donor. *Plant Physiol.* 127: 1299-1309.
123. Roussel A., Hininger-Favier I. 2009. Éléments-trace essentiels en nutrition humaine : chrome, sélénium, zinc et fer. EMC, Elsevier Masson SAS, Paris, Endocrinologie-Nutrition. 21: 213-214.
124. Rufer CE et Kulling SE. 2006. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 2926-2930.
125. Sayre M., Moneira P., Smith M., Perry G. 2008. Metal ions and oxidative protein modification in neurological disease. *Annist super Sanita.* 41: 143-145.
126. Schlorff E., Husain K., Somani S. 1999. Dose-and time-dependent effects of ethanol on plasma antioxidant system in rat. *Alcohol.* 17: 97-105.
127. Sen C. 2001. Antioxidant and redox regulation of cellular signaling: Introduction. *Med Sci Sports Exer.* 33: 368-370.
128. Shanmugasundaram R., Kalpana V., Devi P., TresinaSorin A., Maruthupandian V., Mohan R. 2011. Antidiabetic, antihyperlipidaemic and antioxidant activity of *Senna auriculata* Roxb. *Leaves in alloxan induced diabetic rats. International Journal of Pharm Tech Research.* 2: 747-756.
129. Sharma A., Kharb S., Chugh S., Kakkar R. 2000. Evaluation of oxidative stress before and after control of glycemia and after vitamin E Supplementation in diabetic patient. *Metabolism.* 49: 160-162.

130. **Sies H. 1991.** Role of reactive oxygen species in biological processes. *Klin Wochenschr* 69 : 8-10.
131. **Stadtman ER., 1990.** Metal-ion catalysed oxidation of proteins: biochemical mechanism and biological consequences. *Free Rad Biol Med.* 9: 315-325.
132. **Stevnsner T., Tharslund T., Desouza-pinto N., Boher V. 2002.** Mitochondrial repair of 8-oxoguanine and changes with aging. *Exp. Gerontol.* 37: 1189-1196.
133. **Stief T. 2000.** The blood fibrinolysis/deep-Sea analogy : a hypothesis on the cell signals singlet oxygen/ photons as natural anti-hormones. *Throm Res.* 99: 01-06.
134. **Szkudelski T. 2001.** The Mechanism of Alloxan and Streptozotocin Action in B Cells of the Rat Pancreas. *Physiol Res* 50: 543-546.
135. **Takahashi K., Avissar N., Whitin J., Cohen H. 1987.** Purification and characterization of human plasma glutathione peroxidase: a selenoglycoprotein distinct from the known cellular enzyme. *Arch Biochem Biophys.* 256: 677-686.
136. **Takeuchi H., Lu Z G., Fujita T. 2004.** *Bioscience, biotechnology and biochemistry* 68 (5): 1113- 1134.
137. **Tsimikas S. 2006.** Measures of oxidative stress. *Clin Lab Med* 26:571-590.
138. **Ursini F., Heim S., Kiess M., Maiorino M., Roveri A., Wissing J., Flohe L. 1999.** Dual function of the selenoprotein PHGPx during sperm maturation. *Science.* 285: 1393- 1396.
139. **Ursini F., Maiorino M., Brigelius-Flohe R., Aurnann K., Roveri A., Schomburg D., Flohe L. 1995.** Diversity of glutathione peroxidases. *Methods Enzymol.* 25: 38-53.
140. **Vats V., Yadav S., Grover J. 2004.** Ethanolic extract of *Ocimum sanctum* leaves partially attenuates streptozotocin induced alterations in glycogen content and carbohydrate metabolism in rats. *J. Ethnopharmacol.* 90: 155-160.
141. **Veerapur K., Prabhakar S., Vipin-Kumar R., Parihar K., PunitBansal K., Srinivasan K. 2010.** Unnikrishnan, Antidiabetic, hypolipidaemic and antioxidant activity of *Dodonaea viscosa* aerial parts in streptozotocin-induced diabetic rats. *International Journal of Phytomedicine.* 2: 59-70.
142. **Wallace C. 2008.** Mitochondria as Chi. *Genetics.* 179: 727-735.
143. **Watkins D., Cooperstein SJ., Lazarow A.1964.** Effect of alloxan on permeability of pancreatic islet tissue in vitro. P 22.
144. **Watson H., Yang X., Choi E., Jones P., Kehrer J. 2004.** Thioredoxin and its role in toxicology. *Toxicol Sci.* 78: 3-14.

145. **Weckbeker G et Cor J. 1988.** Ribonucleotide reductase activity and growth of Glutathoine-depleted mous leukemia L1210 cells in vitro. *Cancer letter* 40: 257-260.
146. **Wenger C. 1984.** Alkaline phosphatase. Toronto. Princeton. P:1094-1098.
147. **Yano Y., Satomi M., Oikawa H. 2006.** International J Food Microbiology. 111: 6-10.
148. **Zidi S. 2009.** Contribution à l'étude de l'effet antidiabétique potentiell'un extrait aqueux de *Crataegus azarolus* Chez des rats Wistar avec un diabète induit à l'alloxane. *J. Ethnopharmacol.* 90: 243-244.

# **Annexes**

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

