



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



Université Larbi Tebessi Tébessa
Faculté des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la Vie
Département des Etre-vivants
Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de Master
Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie
Filière : Sciences Biologiques
Spécialité : Biotechnologie végétale

Thème

**Evaluation des biomarqueurs de la toxicité pulmonaire de
deltaméthrine et lambda-cyhalothrine chez les souris et action
protectrice d'un extrait végétal**

Présenté par :

Benaida Hanane

Terea Souad

Devant le jury :

M. Soltani Nedjmeddine	MAA	Université de Tebessa	Président
M. Menaceur Fouad	MCA	Université de Tebessa	Rapporteur
M. Gasmi Salim	MAB	Université de Tebessa	Examineur

Année universitaire : 2018/2019

Note :..... / 20 ; Mention :.....

Remerciements

*Tout d'abord, nous remercions **DIEU**, notre créateur tout puissant de nous Avoir donné la force, la volonté et le courage de mener ce modeste travail à terme.*

***Dr. MENACEUR Fouad**, pour avoir accepté de nous encadrer, pour son aide, ses précieux conseils, ses orientations et pour toute l'attention qu'il nous a prodigués tout au long de la réalisation de ce mémoire.*

*Nous adressons nos sincères remerciements à **M. Soltani NedjemEddine**, pour l'honneur qu'il nous fait de présider le jury de ce mémoire.*

*Nous tenons à remercier vivement, **Dr. Salim GASMI**, de nous faire l'honneur d'accepter d'examiner ce modeste travail.*

*A **M. Brahim Benaicha**, pour son soutien et ses précieux conseil ainsi que son accompagnement durant toute la période de réalisation de cette thèse.*

À tous ceux qui, d'une manière ou d'une autre, nous ont soutenu ou aidé d'une façon ou d'une autre durant la réalisation de ce travail.

Dédicaces

A mes très chers parents qu'ils trouvent ici toute ma

gratitude

pour leur Soutien tout Au long de mes études.

A mes chers frères et sœurs.

A tous Mes amies et mes collègues.

Je dédie ce modeste travail.

Hanene et soued

Résumé

L'objectif de ce travail était l'évaluation la pneumo-toxicité de deux pesticides (deltaméthrine et lambda-cyhalothrine) chez les souris *Mus musculus* L. et l'étude de l'effet protecteur de l'extrait hydro-méthanolique des écorces du grenadier *Punica granatum* contre cette toxicité.

L'étude a été menée sur 32 souris âgées 2 à 3 semaines de et pesant entre 25g à 38g et traitées par la deltaméthrine (50 mg/kg/j), et la lambda-cyhalothrine (3,8 mg/kg/j) et l'extrait hydro-méthanolique (50 mg/kg/j) des écorces de grenadier seuls ou en mixture, administrées subchroniquement par voie orale pendant 15 jours. Les souris sont divisées en huit groupes à l'ordre de 04 individus par groupe. Le premier groupe a servi comme témoin et reçu l'eau distillée. Les autres groupes ont été traités par les pesticides et l'extrait seul ou en mixture.

Les paramètres du poids des souris ont été calculés « Gain de poids et poids relatif des poumons ». Le taux des différents métabolites « glucide, lipides et protéines » ont été estimer et les paramètres enzymatiques « Glutathion Peroxydase (GPx) et Catalase (CAT) » du stress oxydatif ont été évaluer. Le Malondialdéhyde (MDA) a été également dosé au niveau du tissu des poumons.

Les résultats obtenus à la fin de notre expérimentation ont montré que le traitement par les pesticides a induit des changements dans les paramètres métaboliques et enzymatiques avec une augmentation de l'activité enzymatique de GPx et MDA qui est un biomarqueur de peroxydation lipidique avec une diminution d taux de protéine et de l'activité de catalase (CAT) dans le lot traité par la mixture des deux pesticides.

Le traitement des souris avec de le *Punica granatum* a fait face contre la toxicité causés par la lambda-cyhalothrine et la deltaméthrine, seul ou combinés, par sa capacité de piéger les radicaux libres et réduire les effets toxiques qui les induits.

Mots clés : *Punica granatum*, stress oxydant, deltaméthrine, lmbda-cyhalothrine, souris.

ملخص:

الهدف من هذا العمل هو تقييم السمية الرئوية لإثنين من المبيدات الحشرية (الدلتاميثرين ولامدا سيالوثرين) على فئران *Mus musculus*. ودراسة التأثير الوقائي لمستخلص الميثانول المائي للحاء الرمان *Punica granatum*L. ضد هذه السمية.

و قد أجريت الدراسة على 32 فأرا تتراوح أعمارهم بين 2 إلى 3 أسابيع و ذات وزن 25 غ إلى 38 غرام. لتحقيق هذه الدراسة استخدمنا اثنين من المبيدات الحشرية الدلتاميثرين و اللامداسيالوثرين. ومستخلص الميثانول للحاء الرمان وحده أو كخليط بجرعات متتالية من 3.8 مغ / كغ / يوم لامداسيالوثرين ، 50 مغ / كغ / يوم للدلتاميثرين و 50 مغ / كغ / يوم لمستخلص الميثانول ، تعطى عن طريق الفم بشكل متزامن لمدة 15 يوما. تم تقسيم الفئران إلى ثماني مجموعات متكونة من 04 أفراد لكل مجموعة. تركت المجموعة الأولى كشاهد وتم إعطاؤها الماء المقطر. تم علاج المجموعات الأخرى بالمبيدات ومستخلص الميثانول بمفردها أو كخليط.

قمنا بحساب خصائص الوزن للفئران " زيادة الوزن والوزن النسبي للرتنين" وكذا تقدير مستويات المستقبلات المختلفة "الكربوهيدرات والدهون والبروتينات" والخصائص الأنزيمية "الجلوتاثيون بيروكسيداز (GPX) والكاتالاز (CAT) و أيضا قياس نسبة (MDA) في أنسجة الرتنين.

أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها في نهاية تجربتنا أن المعالجة بالمبيدات الحشرية تسببت في تغييرات في الخصائص الأيضية والإنزيمية وزيادة في النشاط الأنزيمي لـ GPx و MDA والذي يعد علامة بيولوجية لبيروكسيد الدهون وكذا انخفاض في مستوى البروتين ونشاط الكاتالاز (CAT) في المجموعة التي يعالجها خليط المبيدات.

كما أظهرت أيضا معالجة الفئران باستخدام *Punica granatum* قدرتها على مواجهة السمية التي تسببها لامدا سيالوثرين ودلتاميثرين ، وحدها أو مجتمعة ، من خلال قدرتها على حبس الجذور الحرة وتقليل الآثار السامة التي تحفزها.

الكلمات المفتاحية: *Punica granatum*، الأكسدة، دلتاميثرين، لامداسيالوثرين، فئران.

Abstract :

The objective of this work was to evaluate the pneumo-toxicity of two pesticides (deltamethrin and lambda-cyhalothrin) in *Mus musculus* L. mice and the study of the protective effect of the hydro-methanolic extract of the bark of the Pomegranate *Punica granatum* against this toxicity.

The study was conducted on 32 male and female mice aged 2 to 3 weeks weighing 25g to 38g and treated with deltamethrin (50ml / kg / day) and lambda-cyhalothrin (3.8ml / kg) / j) and the hydro-methanolic extract (50 ml / kg / day) of grenadier peel alone or in a mixture, administered subchronically orally for 15 days. The mice are divided into eight groups on the order of 04 individuals per group. The first group served as a control and received distilled water. The other groups were treated with pesticides and extract alone or as a mixture.

Mouse weight parameters were calculated as "weight gain and relative weight of the lungs". The levels of the various metabolites "carbohydrate, lipids and proteins" were estimated and the enzymatic parameters "Glutathione Peroxidase (GPx) and Catalase (CAT)" oxidative stress were evaluated. Malondialdehyde (MDA) was also measured in the tissue of the lungs.

The results obtained at the end of our experiment showed that the pesticide treatment induced changes in the metabolic and enzymatic parameters with an increase in the enzymatic activity of GPx and MDA which is a biomarker of lipid peroxidation with a decrease in protein level and catalase activity (CAT) in the batch treated by the mixture of the two pesticides.

The treatment of mice with *Punica granatum* has faced the toxicity caused by lambda-cyhalothrin and deltamethrin, alone or in combination, by its ability to trap free radicals and reduce the toxic effects that induce them.

Key words: *Punica granatum*, oxidative stress, deltamethrin, lmbda-cyhalothrin, mouse.

Liste des abréviations

BBC : Bleu brillant de Coomassie

BHT : Butyl hydroxy toluene

BSA : Bovine sérum albumine

°C : degré Celsius

CAT: Catalase

DO : Densité optique

DTNB : l'acide 5-5'-dithio-bis-2-nitrobénoïque

EXT: Extrait méthanolique

Fd : Facteur de dilution

h : heure

j : jour

g : gramme

GPx : Glutathion peroxydase

GSH : Glutathion réduit

MDA : Acide Malon-dialdéhyde

mg : Milligramme

ml : millilitre

min : minute

NaCl : Acide chlorhydrique

NADPH : Nicotinamide-adéninedinucléotide-phosphate réduit.

NaH₂PO₄ : Sodium phosphate monobasique

nm : nanomètre

PBE : poids des boites pleins après séchage

PBV : poids des boites vide en gramme.

PC : poids corporel

PH : Potentiel en Hydrogène

Pp : poids des poumons

PRp : poids relatif des poumons

RE : rendement d'extraction en pourcentage

ROS : Radicaux libres de l'oxygène

SOD : superoxyde dismutase

TBA : Acide thiobarbiturique

TBS : Tris buffered saline

TCA : Trichloroacétique.

TP : tampon phosphate

µl : microlitre

µmol: micromoles

Liste des figures

N°	Titre	Page
01	Exemple de <i>structure</i> d'un tanin condensé (Macheix <i>et al.</i> , 2005)	5
02	Structure de base des flavonoïdes (Rackova <i>et al.</i> , 2005)	9
03	Fleurs et fruits du Grenadier (<i>Punica granatum L</i>) (Von Deutschland et Schweiz, 1885).	11
04	Classification des antioxydants (Ratnam <i>et al.</i> , 2006)	18
05	Structure de la vitamine E (Bast et Haenen, 2002)	20
06	Structure de la vitamine C (Gaté <i>et al.</i> , 1999)	20
07	Modes d'exposition de l'homme aux pesticides (CPP, 2002).	23
08	Formules chimiques développées (a) d'un pyréthrinolde de type I, la perméthrine et (b) d'un pyréthrinolde de type II, la cyperméthrine (Morgan, 2012).	25
09	Lambda-cyhalothrine (Velmurugan <i>et al.</i> , 2007).	27
10	Les cages de souris	30
11	Traitement de souris	32
12	Sacrifice et prélèvement des organes	33
13	Les différentes étapes du protocole expérimental utilisé	34
14	Réaction du dialdéhyde malonique avec l'acide thiobarbiturique.	36
15	Evolution du poids relatif des poumons (PRp) chez les souris traitées durant 15 jours par les pesticides et l'extrait hydro-méthanolique.	40
16	Evolution du gain de poids corporel (GP) chez les souris témoins et traités après 15 jours de traitement par les pesticides et l'extrait hydro-méthanolique.	41
17	Variation de teneur en protéines (mg/ml) chez les souris traitées durant 15 jours par les pesticides et l'extrait hydro-méthanolique.	42
18	Variation de teneur en lipides (mg/ml) chez les souris traitées durant 15 jours par les pesticides et l'extrait hydro-méthanolique.	43
19	Variation de teneur en glucide (mg/ml) chez les souris traitées durant 15 jours par les pesticides et l'extrait hydro-méthanolique.	44
20	Taux de MDA ($\mu\text{mol}/\text{mg}$) chez les souris traités durant 15 jours par les pesticides et l'extrait hydro-méthanolique	45
21	Activité de GPx ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$) chez les souris traitées durant 15 jours par les pesticides et l'extrait hydro-méthanolique.	46
22	Taux de CAT ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$) chez les souris traités durant 15 jours par les pesticides et l'extrait hydro-méthanolique	47

Liste des tableaux

N°	Titre	Page
01	Structure des squelettes des polyphénols (Crozier <i>et al.</i>, 2006).	3
02	Effets néfastes des pesticides sur l'environnement (Sibieude <i>et al.</i>, 1993).	23
03	Principales propriétés physico-chimiques et toxicologiques de deltaméthrine (INRS, 2007 ; Toumi, 2013 ; Shivanoor et David, 2014).	26
04	Classification des souris (Orsini <i>et al.</i> 1983).	29

Sommaire

Remerciement

Dédicace

Résumé

ملخص

Abstract

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction générale..... 1

Synthèse bibliographique

Chapitre 1 : Les composés phénoliques

1. Définition.....	2
2. Structure et classification.....	2
2.1. Structure.....	2
2.2. Classification.....	3
3. Extraction des composés phénolique	7
3.1. Extraction assistée par micro-ondes.....	7
3.2. Extraction par macération.....	8
4. Activité des composés phénoliques.....	9
4.1. Activité anti-inflammatoire.....	9
4.2. Activité antibactérienne.....	9
4.3. Activité anticancéreuse.....	9
4.4. Activité antioxydante.....	10

Chapitre 2 : Monographie d'espèce étudiée

Punica Granatum

1. Généralité.....	11
1.1. Présentation.....	11
1.2. Historique.....	12
2. Classification.....	12
3. Caractères botanique.....	13
3.1. Description générale du grenadier.....	13
3.2. Les feuilles.....?	13

3.3. Fleurs.....	13
3.4. Ecorce du fruit.....	14
4. Utilisations et propriétés thérapeutiques.....	14
4.1. Les différentes utilisations de la grenade.....	14
4.2. Propriétés thérapeutiques.....	15

Chapitre 3 : Oxydation et antioxydants

1. Stress oxydatif.....	17
1.1. Origine du stress oxydatif.....	17
1.2. Maladies liées au stress oxydatif.....	17
2. Antioxydants.....	17
2.1. Classification des antioxydants.....	17
2.2. Système de défense des antioxydants.....	18

Chapitre 4 : Les pesticides

1. Historique.....	21
2. Définition.....	21
3. Classification.....	21
4. Valeurs toxicologiques des pesticides.....	22
4.1. La dose journalière admissible (DJA).....	22
4.2. limite maximale de résidus (LMR).....	22
5. Les effets des pesticides sur l'environnement.....	22
6. Mode d'exposition des pesticides.....	23
7. Les pyréthrinoides.....	24
7.1.Généralités.....	24
7.2.Classification.....	24
7.3.Exemples sur les pyréthrinoides.....	25
7.3.1. La deltamethrine.....	25
➤ Propriétés.....	25
➤ Toxicité.....	25
7.3.2. la lambda-cyhalothrine.....	26
➤ Propriétés.....	27
➤ Toxicité.....	27

Partie expérimentale

Chapitre 1 : Matériels et méthodes

1. Matériel biologique.....	29
1.1. Matériel animal.....	29

1.2. Matériel végétal.....	30
1.3. Matériel chimique.....	31
2. Traitement des souris.....	31
3. Mesure de poids des souris.....	32
4. Sacrifice et prélèvement des organes.....	32
5. Préparation de l'homogénats des organes.....	33
6. Préparation des solutions.....	33
7. Evaluation des paramètres biochimiques et enzymatiques.....	35
8. Etude statistiques.....	39
Résultats et discussion	
Résultats	40
1. Effets de pesticides et l'extrait hydro-méthanolique sur le paramètre de la croissance (Poids relatif et gain de poids) chez les souris.....	40
1.1. Poids relatif.....	40
1.2. Gain de poids.....	41
2. Étude des paramètres biochimiques et enzymatiques.....	42
2.1. Effet des pesticides et l'extrait hydro-méthanolique sur les paramètres biochimiques chez les souris.....	42
2.1.1. Taux des protéines.....	42
2.1.2. Taux des lipides.....	43
2.1.3. Taux de glucide.....	44
2.2. Effet des pesticides et l'extrait hydro-méthanolique sur les paramètres enzymatiques chez les souris.....	45
2.2.1. Effet des pesticides et l'extrait hydro-méthanolique sur la teneur de malondialdéhyde (MDA).....	45
2.2.2. Effet des pesticides et l'extrait méthanolique sur les variations de l'activité de la glutathion peroxydase GPx.....	46
2.2.3. Effet des pesticides et l'extrait méthanolique sur la teneur de Catalase (CAT).....	47
Discussion	48
1. Effet de lambda-cyhalothrine et le deltaméthrine et le <i>Punica granatum</i> sur le gain de poids et l'évolution du poids corporel relatif chez les souris.....	48
2. Effet de lambda-cyhalothrine et le deltaméthrine et le <i>Punica granatum</i> sur les paramètres métaboliques chez les souris.....	48

3. Effet de lambda-cyhalothrine et le deltaméthrine sur la teneur de malondialdéhyde (MDA) chez les souris.....	49
4. Effet des de lambda-cyhalothrine et le deltaméthrine sur l'activité de la glutathion peroxydase GPx.....	49
5. Effet des de lambda-cyhalothrine et le deltaméthrine sur la teneur de Catalase (CAT).....	50
6. Effet de <i>Punica granatum</i> sur les paramètres de stress oxydatif.....	50
Conclusion.....	51
Références bibliographiques	
Annexe	

Introduction générale

Introduction générale

Pesticides encore appelés produits phytosanitaires, qualifie un groupe de substances chimiques utilisées pour la prévention, le contrôle ou l'élimination d'organismes vivants jugés nuisibles, principalement aux cultures. C'est aussi le nom de tout produit fabriqué à partir de ces substances. On les classe selon leur fonction en insecticides, fongicides, herbicides, molluscides, nématocides, acaricides, rodenticides, etc. **(Perze-Vincent et al., 2002)**.

Pendant ces années récentes, l'utilisation des pesticides dans l'agriculture avait augmenté. Cette large diffusion d'utilisation des pesticides porte plus d'exposition des ouvriers agricoles et industriels aussi bien que la contamination de nourriture. **(Mertens-Talcott et al., 2006**

Les polyphénols et surtout les flavonoïdes sont des antioxydants puissants susceptibles d'inhiber la formation des radicaux libres et de s'opposer à l'oxydation des macromolécules **(Van Acker et al., 1996)**. Les flavonoïdes peuvent aussi inhiber des lipoxygénases qui catalysent l'oxydation d'acide arachidonique en acides gras polyinsaturés. **(Mladinka et al., 2010)**.

Le fruit du grenadier (*Punica granatum* L.) est l'un des fruits les plus populaires en Algérie. Les parties comestibles des grenades peuvent être consommées fraîches ou sous forme transformée. Il renferme des composés précieux dans différentes parties dont des effets fonctionnels et médicaux tels que les effets antioxydants, anticancéreux et anti-athérosclérotiques ont été confirmés. **(Mertens-Talcott et al., 2006; Perze-Vincent et al., 2002)**.

Nous avons choisi pour notre étude deux pesticides le Deltaméthrine et la Lambda-cyhalothrine. En ce qui concerne l'organe étudié, notre choix s'est porté sur les poumons qui sont le principal organe exposé aux risques d'intoxications par inhalation lors de l'application des pesticides sur le couvert végétal.

Cette étude est subdivisée en deux parties essentielles, la première partie présente une synthèse bibliographique dans laquelle nous apportons un premier chapitre qui consiste à étudier des généralités sur les composés phénoliques, une seconde partie sur le *Punica granatum*L. Le troisième chapitre qui traite les effets du stress oxydant et antioxydant. Le quatrième chapitre, est consacré à l'étude de pesticides.

La deuxième partie comprend notre approche méthodologique de recherche et traite les résultats obtenus ainsi que la discussion de ces résultats.

Partie bibliographique

- *Chapitre 1 : Composés phénoliques*
- *Chapitre 2 : Monographie d'espèce étudiée*
Punica Granatum
- *Chapitre 3 : Oxydation et antioxydants*
- *Chapitre 4 : Pesticides*

➤ *Chapitre 1 : Les composés phénoliques*

Introduction

Une des originalités majeures des végétaux réside dans leur capacité à produire des substances naturelles très diversifiées (**Macheix *et al.*, 2005**).

En effet, à côté des métabolites primaires classiques (glucides, protéides et lipides), les végétaux accumulent fréquemment des métabolites dits « secondaires » dont la fonction physiologique n'est pas toujours évidente mais qui représente une source importante de molécules utilisables par l'homme dans des domaines aussi différents que la pharmacologie ou l'agroalimentaire (**Herbert, 1989**). Les métabolites secondaires appartiennent à des groupes chimiques très variés tels les alcaloïdes, les terpènes, les composés phénoliques, etc. (**Marouf, 2000; Macheix *et al.*, 2005**).

1. Définition

Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires (**Balasundram *et al.*, 2006**), ils sont synthétisés par les plantes durant la croissance et pour répondre à différentes situations (stress, UV, radiation...) (**Hurtado-Fernandez *et al.*, 2010**). Plus de 8000 structures ont été identifiées (**Macheix *et al.*, 2005 ; Hurtado-Fernandez *et al.*, 2010**).

Les composés phénoliques appartiennent à la famille des composés aromatiques. Ils se reconnaissent par la présence d'un ou plusieurs groupes hydroxyles modifiés ou pas ; attachés à une structure aromatique (**Richter, 1993**). Les composés phénoliques sont l'un des groupes bioactifs des fruits, légumes et graines ; ils sont localisés au niveau des tissus des plantes (**Li *et al.*, 2011**).

2. Structure et classification :

2.1. Structure :

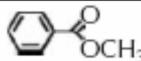
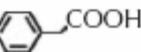
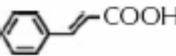
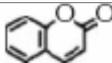
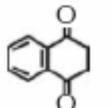
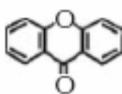
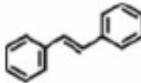
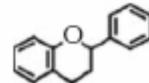
Les composés phénoliques regroupent un vaste ensemble de substances chimiques comprenant au moins un noyau aromatique, auquel sont directement liés un ou plusieurs groupes hydroxyles, libres ou engagés dans une autre fonction chimique (éther, méthylique, ester, sucre...) (**Bruneton, 1993**). Les polyphénols naturels vont de molécules simples, comme les acides phénoliques, à des composés hautement polymérisés comme les tanins.

2.2. Classification :

Les composés phénoliques peuvent être regroupés en de nombreuses classes (**Tableau 01**) qui se différencient d'abord par la complexité du squelette de base (allant d'un simple C₆ à des formes très polymérisées). Ensuite par le degré de modification de ce squelette (degré d'oxydation, d'hydroxylation et de méthylation, etc.). Enfin par les liaisons possibles de ces molécules de base avec d'autres molécules (glucides, lipides, protéines, etc.). (**Herbert, 1989; Macheix *et al.*, 2005**).

Les formes phénoliques les plus simples présentent des structures chimiques allant de simple phénol en C₆ aux flavonoïdes en C₁₅ et à des molécules proches.

Tableau 01 : Structure des squelettes des polyphénols (Crozier *et al.*, 2006).

Nombre de carbones	Squelette	Classification	Exemple	Structure de base
7	C ₆ -C ₁	Acides phénols	Acide gallique	
8	C ₆ -C ₂	acétophénones	Gallacetophénone	
8	C ₆ -C ₂	Acide phénylacétique	Acide p-Hydroxyphénylacétique	
9	C ₆ -C ₃	Acides hydroxycinamiques	Acide p-coumarique	
9	C ₆ -C ₃	Coumarines	Esculitine	
10	C ₆ -C ₄	Naphthoquinones	Juglone	
13	C ₆ -C ₁ -C ₆	Xanthones	Mangiferine	
14	C ₆ -C ₂ -C ₆	Stilbènes	Resveratrol	
15	C ₆ -C ₃ -C ₆	Flavonoïdes	Naringénine	

2.2.1. Les phénols simples :

Tels que le catéchol, guaiacol, phloroglucinol... sont plutôt rares dans la nature à l'exception de l'hydroquinone qui existe dans plusieurs familles (Ericaceae, Rosaceae...). Les deux phénols hydroxylés, le catéchol avec deux groupes OH et le pyrogallol avec trois, ont été montré pour leur toxicité vis-à-vis des microorganismes (Cowan, 1999).

2.2.2 Acides phénoliques :

Le composant principal des acides phénoliques est l'acide gallique son nom est dérive du mot galle, ce qui signifie un gonflement dans le tissu d'une plante après une attaque par des insectes parasites (Gross, 1992). Ils sont répartis en deux classes (Pandey et Rizvi, 2009).

2.2.2.1 Acide phénols dérivés d'acide benzoïque :

Sont des hydroxybenzoïques de structure générale de type (C₆-C₁), ils sont sous forme d'esters ou de glycosides (Harrar, 2012). Les plus fréquents sont: l'acide salicylique et l'acide gallique (Bruneton, 1999).

2.2.2.2. Acide phénols dérivés d'acide cinnamique :

Les acides phénols dérivés de l'acide cinnamique sont souvent estérifiés. La majorité sont l'acide cinnamique, l'acide caféique, l'acide férulique, l'acide *p*- coumarique et l'acide synaptique (Haslam, 1998).

2.2.3. Tanins :

D'après Macheix *et al.*, (2005) ; Valls *et al.*, (2009) ils sont responsables du goût astringent et amer des vins et de certains fruits et légumes (cacao, thé...). Ce phénomène varie et dépend largement de leur degré de polymérisation et de leur structure (Valls *et al.*, 2009). Les tanins sont considérés comme une forme phénolique condensée capable de se lier aux protéines en solution et de provoquer leur précipitation. Classiquement, on distingue deux groupes de tanins qui diffèrent par leurs propriétés chimiques et leurs compositions (Macheix *et al.*, 2005).

2.2.3.1 Tanins hydrolysables :

Très répandus chez les dicotylédones, ils se caractérisent par le fait qu'ils peuvent se dégrader par hydrolyse chimique (acide ou alcaline) ou enzymatique libérant alors une partie phénolique (l'acide gallique ou l'acide ellagique) (Macheix *et al.*, 2005).

2.2.3.2. Tanins condensés :

Se sont des oligo ou polymères de flavane -3-ols et éventuellement de flavane-3,4-diols (Figure 01) (Richter, 1993). Contrairement aux tanins hydrolysables ils résistent à l'hydrolyse et seules les attaques chimiques fortes permettent de les dégrader ; ils se transforment en pigment rouge par un traitement acide à chaud ; c'est pour cette raison que la forme dimère ou oligomère est appelée proanthocyanidine (Macheix *et al.*, 2005 ; Valls *et al.*, 2009).

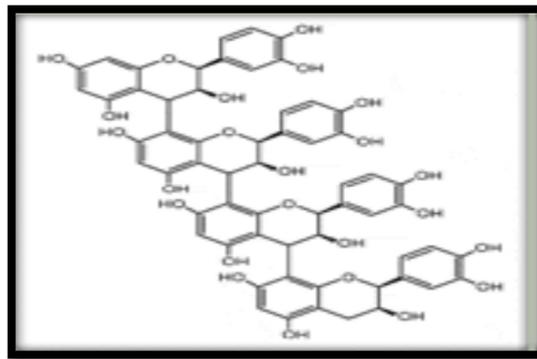


Figure 01 : Exemple de structure d'un tanin condensé
(Macheix *et al.*, 2005)

2.2.4. Flavonoïdes :

Le terme flavonoïde dérive du latin (flavus=jaune) (Richter, 1993). Les flavonoïdes ont une structure générale de C₁₅ (C₆-C₃-C₆) (Machaix *et al.*, 2005 ; Balasundram *et al.*, 2006 ; Ghasemnezhad *et al.*, 2011). Ils se composent de deux noyaux benzéniques (Figure 02) désignés par A et B réunis par une chaîne à trois carbones qui forme un anneau hétérocyclique oxygéné appelé anneau C (Guignard, 1979). La plus part des flavonoïdes se trouvent sous forme d'aglycone lié avec des glycosides, des constituants glucidiques différents peuvent se fixer aux groupements hydroxyyles du cycle A ou plus fréquemment à la position C3 de l'hétérocycle C (Richter, 1993). Les flavonoïdes représentent la plus grande classe des polyphénols (Valls *et al.*, 2009) et sont largement distribués dans les feuilles, les graines, les

écorces et les fleurs des plantes . Plus de 4000 flavonoïdes ont été identifiés jusqu'ici. Ils protègent la plante des UV, microorganismes pathogènes et des herbivores.

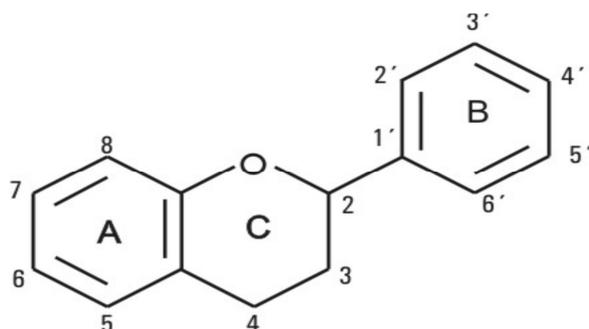


Figure 02: Structure de base des flavonoïdes (**Rackova et al., 2005**)

La classification des flavonoïdes selon **Valls et al., (2009)** est basée sur :

- Le degré d'hydroxylation des différents cycles
- Le niveau de méthylation
- Le niveau de glycosilation

2.2.4.1. Flavones et isoflavones :

La structure des flavones et isoflavones est composée de deux anneaux aromatiques A et B liés à l'anneau hétérocycle oxygéné C (**Luthria et al., 2007 ;Valls et al., 2009**) ayant une double liaison entre C2 et C3 de l'anneau hétérocyclique (**Fliegmann et al., 2010**). La position de l'anneau B est à l'origine de la différenciation de ces deux classes de flavonoïdes : C1 de l'anneau B est lié à C2 de l'anneau C dans les flavones ; alors qu'il est lié à C3 de l'anneau C dans les isoflavones (**Valls et al., 2009**).

Des études bibliographiques ont montré que les isoflavones possèdent des propriétés antivirales importantes (**Andres et al., 2009**).

2.2.4.2. Flavanones :

Ils ont une double liaison de moins dans leurs hétérocycles que les flavones et les isoflavones (**Richter, 1993**). Incolores, ils absorbent fortement dans l'ultraviolet (**Guignard, 1979**).

2.2.4.3. Flavanols et flavanidiol :

Ils composent le groupe des tanins condensés peu ou pas du tous hydrolysables, les flavanols appelés également flavane -3-ols ils se forment à partir de flavanediols par une seule réaction non enzymatique en une seule étape (**Richter, 1993**).

Les flavanediols ou flavane-3,4-diol appelés également leuco-anthocyanes sont incolores et portent deux groupements hydroxyles sur la chaîne réunissant les deux noyaux benzéniques (en position 3,4) (**Guignard, 1979**).

2.2.4.4. Flavonols :

Ils dérivent des flavones par addition d'un groupement hydroxyle en position 3 de l'hétérocycle C (**Guignard, 1979**) ; ils colorient certaines fleurs en jaunes (**Richter, 1993**).

2.2.4.5. Anthocyanine :

Ils dérivent du grec (antho : fleur, cyan : bleu) (**Valls et al., 2009**). L'anthocyanine est un pigment vacuolaire responsable de la couleur rouge ou bleue de beaucoup de fruits et légumes comme les framboises, cassis, aubergines, betterave ... (**Richter, 1993**).

Il est également utilisé comme colorant alimentaire en plus de ses propriétés anti oxydantes, anti-inflammatoires et anti cancérigènes. Ce sont des hétérosides d'unités d'aglycone (anthocyanidine) dérivés de l'ion flavylum. Les propriétés chimiques, la stabilité et la couleur sont influencées par le nombre de groupements hydroxyles, le nombre et la nature du sucre lié à l'anthocyanidine (**Valls et al., 2009**).

3. L'extraction des composés phénolique :

La complexité de la structure et la variabilité (avec les saisons, les récoltes, . . .) de la matière végétale ainsi que la large variété des composés à extraire (différents poids moléculaires, polarité, lien avec la structure, . . .) ont conduit à l'apparition d'une grande variété de technologies d'extraction. On peut citer quelques une :

3.1. Extraction assistée par micro-ondes :

Les micro-ondes peuvent pénétrer les matières biologiques et agir sur les molécules polaires telles que l'eau pour leur communiquer un mouvement de fluctuation ce qui se traduit donc par une augmentation de la température de la matière en question à la profondeur de pénétration.

L'extraction assistée par Micro-ondes (EAM) offre un transfert rapide d'énergie et un chauffage simultané de l'ensemble « solvant et matrice végétale solide ». En absorbant l'énergie des microondes, l'eau présente dans la matrice végétale favorise la rupture des cellules facilitant ainsi la libération des produits chimiques de la matrice et améliorant leur extraction (**Kaufmann, Christen et al., 2001; Besombes, 2008 ; Michel, 2011; Florent, 2011**).

Elle utilise de plus petites quantités de solvant, n'est pas couteuse et est considérablement rapide. La température opératoire de cette technique est relativement haute (100 – 150 °C), ce qui pose des problèmes quand il s'agit de l'extraction des antioxydants. Cette technique est d'une part le rendement faible lorsque les solutés ou les solvants sont apolaires et d'autre part le besoin de l'étape postérieure de filtration ou de centrifugation pour éliminer le résidu solide de l'extrait (**Penchev, 2010**).

3.2. Extraction par macération :

C'est une méthode traditionnelle, a été couramment employée. Elle consiste en la mise en contact du matériel végétal avec le solvant avec ou sans agitation, à température ambiante ou à température élevée pour une durée déterminée. Elle est basée sur la solubilité des composés bioactifs dans un solvant d'extraction et elle est influencée par une série de facteur incluant la nature du matériel végétal, la concentration en solutés de l'échantillon, la nature du solvant, la durée d'extraction...etc (**Spigno et Defaveri, 2007 ; Budic-Letoc et al., 2005**).

La macération est relativement peu coûteuse et aussi la plus simple, elle est utilisable dans le cas de l'extraction d'un ensemble de molécules fragiles et se déroule à température ambiante ce qui est très positif pour conserver l'intégrité des molécules bioactifs qui sont sensibles aux changements de température. En outre, une matrice peut subir plusieurs extractions successives en utilisant des solvants de plus en plus polaires afin d'obtenir des mélanges enrichis en molécules d'intérêt (**Al-Bandak et Oreopoulou, 2007; Escribano-Bailon et Santos-Buelga, 2003**).

Cette technique a été optimisée, notamment, pour l'analyse des composés non volatils (poly phénols, sucres) avec l'utilisation d'une quantité considérable de solvant (**Macleod et Troconis, 1982 ; Kok et al., 1987**).

Pour être efficace, une macération a des temps d'extraction très longs (environ 4 à 10 jours), ceci peut présenter quelques inconvénients, en termes de fermentation, ou de

contamination bactérienne notamment si le solvant utilisé est l'eau (**Macleod et Troconis, 1982 ; Kok *et al.*, 1987 ; Nicolas, 2012**).

4. L'activité des composés phénoliques :

Chez les plantes, les composés phénoliques sont impliqués dans différents processus comme la germination des graines et la croissance des plantes (**Marcheix *et al.*, 2005**). Ces dernières années les recherches sur les composés phénoliques se sont accentuées en raison de leurs activités anti-inflammatoires, antibactériennes et antifongiques, antioxydant et même anticancéreuse (**Montoro *et al.*, 2005**).

4.1. Activité anti-inflammatoire :

Les propriétés anti-inflammatoires des composés polyphénoliques peuvent être dues à leurs capacités d'inhiber des enzymes impliquées dans les processus inflammatoires (**Škerget *et al.*, 2005**) et leurs activités antioxydantes. La matricaire, appelée également la camomille allemande ou camomille commune, est une plante médicinale employée pour ses propriétés antispasmodiques et anti-inflammatoire (**Marcheix *et al.*, 2005**).

4.2. Activité antibactérienne :

Les polyphénols notamment les flavonoïdes et les tanins sont reconnus par leur toxicité vis-à-vis des microorganismes (**Basli *et al.*, 2012**).

4.3. Activité anticancéreuse :

Les flavonoïdes et autres phénols peuvent jouer un rôle préventif dans le développement du cancer (**Genoux 2011**). Ils interviennent dans l'étape d'initiation comme piègeurs des mutagènes électrophiles ou en stimulant la réparation de l'ADN muté. Durant les étapes de promotion et de progression, ils agissent comme des agents suppresseurs de tumeurs par différents mécanismes comme l'induction de l'apoptose et l'inhibition de la prolifération cellulaire (**Gerber *et al.*, 2002**).

4.4. Activité antioxydante :

L'activité antioxydante des composés phénoliques est due à leur capacité à piéger les radicaux libres, donner l'atome d'hydrogène et électron et chélater les cations métalliques. La structure des composés phénoliques est l'élément déterminant de leur activité. Pour les acides phénoliques, l'activité antioxydant augmente proportionnellement avec le degré d'hydroxylation et la présence de groupement C=CH-COOH (**Balasundram *et al.*, 2006**).

Pour les flavonoïdes, la relation structure activité antioxydante est généralement plus compliquée que les acides phénoliques à cause de la complexité de la molécule de flavonoïdes **(Bors *et al.*, 1997).**

➤ ***Chapitre 2 : Monographie d'espèce étudiée***

1. Généralités

1.1. Présentation

Le grenadier est un petit arbre à port arbustif des régions méditerranéennes qui peut atteindre 6 m de haut. Ses fleurs rouge vif mesurent 3 cm de diamètre. Ses fruits, les grenades, contiennent en moyenne 600 graines pulpeuses. La grenade est une grosse baie ronde, de la taille d'une grosse orange, à écorce dure et coriace, de couleur rouge ou jaune beige, qui renferme de nombreux pépins de couleur rose à rouge (**figure 03**). Seuls ses pépins sont comestibles, soit environ la moitié du fruit. Dans chaque pépin, la graine est enrobée d'une pulpe gélatineuse de chair rouge transparente, sucrée chez les variétés améliorées, sinon d'un goût plutôt âcre (**Benoît Bock, 2013**).

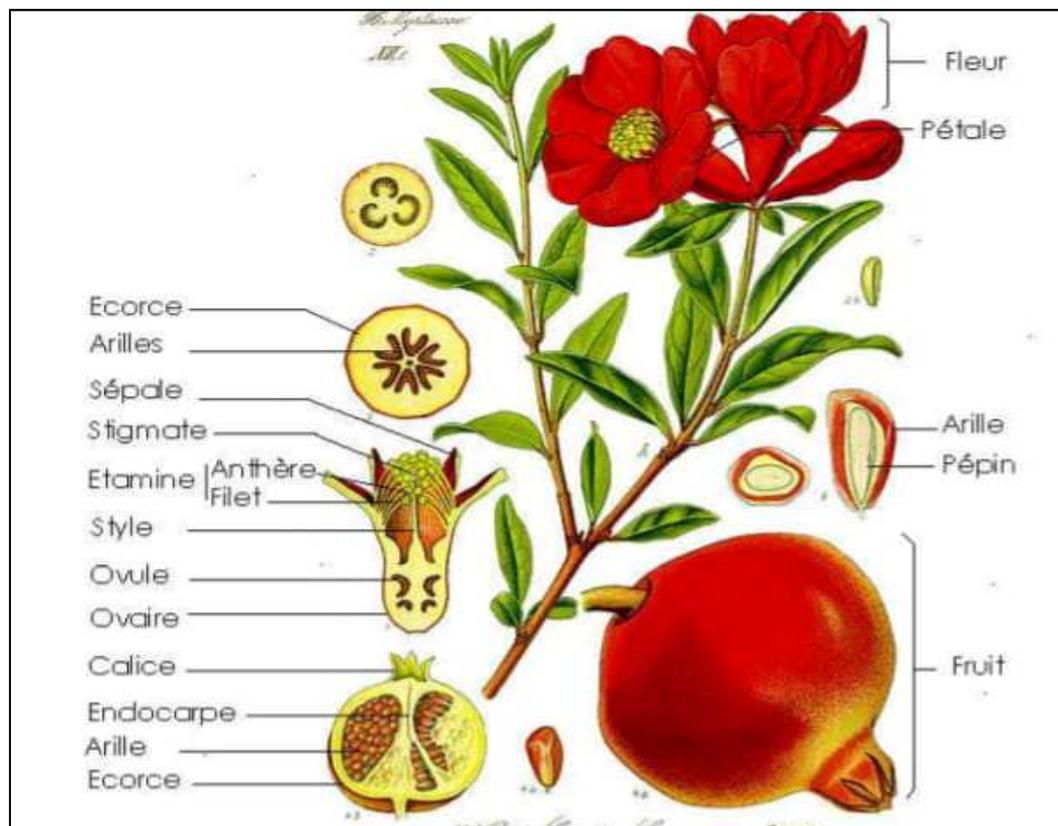


Figure 03 : Fleurs et fruits du Grenadier (*Punica granatum* L.) (Von Deutschland et Schweiz, 1885).

1.2. Historique

La grenade est le fruit du grenadier (*Punica granatum* L.). Ce petit arbre buissonnant est originaire de bassin méditerranéen, d'Asie Occidentale et du Moyen-Orient, où il est cultivé depuis 5000 à 6000 ans. Son nom est dérivé du latin « granatum » qui signifie « fruit à grain » (QA international collectif, 1996). La grenade est souvent mentionnée dans la mythologie grecque, ainsi que dans la Bible et le Coran, preuve que ce fruit est connu et consommé depuis des millénaires. Outre la dimension symbolique dont elle était revêtue, la grenade était appréciée à l'époque pour les propriétés vermifuges de son écorce, mais aussi pour sa pulpe désaltérante et son aptitude à se conserver et à résister aux chocs, grâce à son écorce rigide. Les voyageurs et les caravaniers l'emportaient donc avec eux comme provision de bouche : le grenadier s'est ainsi rapidement répandu vers l'Est (Asie) et vers l'Ouest (bassin méditerranéen), grâce aux pépins du fruit. Cet arbre fruitier est aujourd'hui cultivé un peu partout dans le monde, sous les climats chauds et secs (Calin Sanchez et al., 2005).

2. Classification

En botanique, il existe plusieurs systèmes de classification, la classification traditionnelle étant à distinguer de la classification APG (Angiosperm Phylogeny group). *Punica granatum* n'appartient pas à la même famille selon le système de classification utilisé.

2.1. Classification de Linné :

En 1753, le grenadier a été classé par **Carl Von Linné (1707-1778)** comme suit :

Règne	Plantae
Embranchement	Spermatophyta
Sous embranchement	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Ordre	Myrtales
Famille	Punicaceae
Genre	Punica
Espèce	<i>Punica granatum</i> L. 1753

La famille des Punicaceae, d'après **Melgarejo et Martínez (1992)** ; **Rana et al., (2010)**, est une famille monogénérique, c'est-à-dire qui contient un seul genre *Punica*. Ce dernier est représenté uniquement par deux espèces. D'une part, *Punica granatum*, et d'autre part, *Punica protopunica*, espèce endémique recensé sur l'île de Socotra au Yémen. Tandis que *Punica nana* est traitée comme étant la troisième espèce du genre *Punica* (**Teixeira da Silva et al., 2013**).

Cette famille (Punicaceae) constitue avec la famille des Myrtaceae, Lythraceae, Sonneratiaceae et celle des Melastomataceae, une relation phylogénétique étroite. A un certain moment, cette proximité est devenue la raison de la mise en relation consécutive du genre *Punica* L. avec certaines de ces familles (Myrtaceae, Lythraceae, Sonneratiaceae).

3. Caractères botaniques :

3.1. Description générale du grenadier :

Le grenadier est un arbre ou arbuste buissonnant de 2 à 5 m de hauteur, légèrement épineux, au feuillage caduc et au tronc tortueux. Il croît majoritairement dans toute la région méditerranéenne, de façon subspontanée ou cultivée.

3.2. Les feuilles :

Les feuilles du grenadier sont opposées. Elles peuvent avoir une disposition alterne sur les rejets ou être en touffes sur les pousses courtes. Elles sont glabres sur les deux faces. La face supérieure est vert foncé et à nervure médiane nettement déprimée. La face inférieure, vert clair, montre une nervure médiane très saillante. Ces feuilles entières, lancéolées, assez coriaces, et brillantes, présentent un limbe elliptique allongé, de 3 à 8 cm de long. Leur sommet peut être obtus ou allongé. Elles sont munies d'un court pétiole, de 1 à 5 mm de long, qui est généralement rougeâtre dessus. (**Godjet, 1991**). Elles ne possèdent pas de stipule.

3.3. Les fleurs :

Les fleurs du grenadier portent également le nom de balaustes. Elles sont très ornementales. Les fleurs rouge pourpre ou grenat, d'aspect froissé, portées par un court pédoncule, solitaires à l'aisselle des feuilles ou réunies par groupe de deux ou trois au sommet des branches, s'ouvrent de mai à juillet. Les fleurs du grenadier sont actinomorphes et hermaphrodites. Les fleurs sèches sont sans odeur. Elles ont une saveur âpre et astringente et donnent à la salive une teinte violacée.

3.4. L'écorce du fruit :

L'écorce du fruit du grenadier est également appelée *malicorium*. Il s'agit de la partie dure du fruit. Elle est généralement utilisée séchée, sous la forme de morceaux brunâtres ou vert rougeâtre à l'extérieur, un peu verruqueux, brillants, jaunâtres sur la face intérieure concave, portant souvent l'empreinte des graines qui y étaient appliquées.

Ces fragments sont de consistance coriace. Ils sont formés d'un parenchyme de cellules à parois minces, au milieu desquelles on distingue des groupes de cellules pierreuses et des faisceaux fibro-vasculaires. La saveur de l'écorce de grenade est amère et astringente.

4. Utilisations et propriétés thérapeutiques :

4.1. Les différentes utilisations de la grenade :

4.1.1. Utilisation alimentaire :

La partie comestible de la grenade constitue environ 52% du poids du fruit (**Abbasi et al., 2008**). Les grenades sont consommées de préférence fraîches ou en jus de grenadine rafraîchissant (**Oukabli, 2004**). La teneur en jus se situe autour de 35 à 50 ml/100 g de graines.

C'est un fruit riche en vitamine C et en éléments minéraux. (**Oukabli, 2004**). Dans certains pays, comme l'Iran, le jus de grenade est une boisson très populaire (**Morton, 1987**).

4.1.2. Utilisation industrielle :

4.1.2.1. Tannage du cuir :

Toutes les parties de l'arbre ont été utilisées comme sources de tannins lors du tannage des peaux. L'écorce du tronc contient 10 à 25% de tanins et était autrefois très utilisée dans la production du cuir au Maroc. L'écorce des racines contient 28% de tanins, les feuilles 11%, et l'écorce du fruit 26%. (**Morton, 1987**).

4.1.2.2. Teinture et colorant :

L'écorce du fruit et les fleurs sont utilisées pour teindre le textile. L'écorce de la grenade, a été utilisée en Inde comme une teinture depuis les temps les plus anciens. De l'encre a été produit à partir des feuilles en les macérant dans du vinaigre (**Morton, 1987**).

4.1.3. Utilisation médicinale :

Le grenadier, qui dit-on a fleuri dans le Jardin d'Eden, a été largement utilisé en médecine traditionnelle dans de nombreuses cultures (**Lansky et al., 2000**). La grenade est considérée

comme un fruit complet dans le Coran. L'ancienne science médicale indienne Ayurveda la identifiée comme une plante médicinale. (Kulkarni *et al.*, 2004).

Dans le monde, la plus célèbre utilisation a été celle d'un vermifuge ou agent ténicide, tueur et expulseur des vers intestinaux. Les alcaloïdes contenus dans les racines, l'écorce de l'arbre et l'écorce du fruit induisent le relâchement du ténia et de son emprise sur la paroi intestinale, ce qui facilite son expulsion (Lansky *et al.*, 2000).

L'écorce de grenade, les racines et les feuilles ont été utilisées en décoction pour traiter les diarrhées, les troubles digestifs et stopper les hémorragies. Les fleurs séchées sont utilisées pour guérir les bronchites et les inflammations buccales (Stover et Mercure, 2007).

D'autres utilisations ont été mentionnées dans la littérature : empêcher la fécondation et avorter, traitement des morsures de serpent, du diabète, de la lèpre et des brûlures (Lansky *et al.*, 2000).

4.2. Propriétés thérapeutiques :

4.2.1. Propriétés antioxydants de la grenade :

Un rapport de l'OMS, datant de novembre 2003, sur l'alimentation, la nutrition et la prévention des maladies chroniques, recommande la consommation journalière d'au moins 400g de fruits et de légumes (à l'exclusion des féculents tels que les pommes de terre) pour prévenir les maladies chroniques, et notamment les cardiopathies, les cancers, le diabète de type II et l'obésité. (Sarkhosh., *et al.* 2006).

Les effets bénéfiques sur la santé qui sont attribués à la consommation de fruits et de légumes sont, au moins en partie, liés à leurs activités antioxydants. En effet, chez les végétaux comestibles, on compte plusieurs centaines de molécules antioxydants. Parmi les plus connus de ces antioxydants naturels, on trouve la vitamine C et la vitamine E, les caroténoïdes (β -carotène et lycopène), et les polyphénols (tanins, flavonoïdes, anthocyanes). Pour qu'un composé soit défini comme antioxydant, il doit satisfaire à deux conditions : Présent à faible concentration par rapport au substrat oxydé, il doit retarder ou empêcher l'auto-oxydation ou l'oxydation causée par des radicaux libres. Les radicaux libres neutralisés par ce composé doivent former une entité stable, afin d'interrompre la chaîne des réactions d'oxydation. (Sarkhosh., *et al.* 2006).

4.2.4. Inhibition de l'oxydation des LDL :

Les polyphénols de jus de grenade protègent les LDL contre l'oxydation à médiation cellulaire via deux mécanismes qui mettent en jeu une interaction directe des polyphénols avec la lipoprotéine et/ou une action indirecte liée à l'accumulation des polyphénols dans les

macrophages artériels. Il a ainsi été démontré que les polyphénols de grenade inhibent l'oxydation des LDL en détruisant les espèces réactives de l'oxygène et de l'azote. Par ailleurs, les polyphénols de grenade augmentent l'activité paraoxonase sérique, ce qui entraîne l'hydrolyse des peroxydes lipidiques dans les lipoprotéines oxydées et dans les lésions athérosclérotiques. Ces propriétés antioxydantes et antiathérogènes des polyphénols de grenade ont été démontrées *in vitro* ainsi qu'*in vivo* chez l'être humain et chez la souris athérosclérotique déficientes en apolipoprotéine E. (**Aviram et al., 2002**).

➤ *Chapitre 3 : Oxydation et antioxydants*

1. Stress oxydatif :

L'augmentation de la production des radicaux libres dans la cellule provoque le stress oxydatif (**Powers *et al.*, 2011**) qui est un déséquilibre de la balance physiologique entre les oxydants et les antioxydants (**Deaton *et al.*, 2003 ; Jeyaramraja, 2005**). Il se produit lorsque la génération des radicaux libres excède la capacité du mécanisme de défense des antioxydants (**Poston et Raijmakers, 2004**).

1.1. Origine du stress oxydatif :

Le stress oxydatif est un événement important dans la cellule (**Therriault *et al.*, 2006**). Les effets de ce stress sont les conséquences de l'oxydation des molécules importantes (**Jeyaramraja, 2005**), tels que les lipides, les protéines et l'ADN (**Thomas *et al.*, 2010**).

1.2. Maladies liées au stress oxydatif :

Le stress oxydatif provoqué par les ERO jouent un rôle important dans l'apparition de plusieurs maladies chroniques et dégénératives (**Fu *et al.*, 2011 ; Nair *et al.*, 2012**). Le stress oxydatif provoque l'oxydation des lipides de la membrane cellulaire (**Sun *et al.*, 2011**) et affecte les fonctions physiologiques et mentales (**Miwa et Fujita, 2008**).

D'après **Miwa et Fujita (2008)** le stress oxydatif augmente par la présence de divers facteurs de risques tels que : le tabagisme l'hypertension, le diabète et l'obésité.

2. Les antioxydants :

Un antioxydant est défini comme une substance qui retarde ou empêche l'oxydation d'un substrat oxydable (**Deaton et Marlin, 2003**). Les antioxydants peuvent empêcher ou retarder le processus d'oxydation causé par les radicaux libres et les espèces réactives de l'oxygène (**Heo *et al.*, 2006 ; Vannucchi *et al.*, 2007**).

D'origine diverses, ils peuvent être produits dans l'organisme, ou être apportés par l'alimentation ou bien issus d'une synthèse chimique (**Tamimi *et al.*, 2002**). Les antioxydants des plantes sont hydrosolubles (**Hayouni *et al.*, 2007**).

2.1. Classification des antioxydants :

On distingue deux grandes classe d'antioxydants ; enzymatiques et non enzymatiques. Les principaux antioxydants sont résumés dans la **figure 04**.

2.2. Système de défense des antioxydants :

Le système de défense des antioxydants est composé de molécules de faible poids moléculaire ; enzymes intracellulaires, les vitamines (A, E, C...), les composés phénoliques et

certain minéraux tels que le Zinc et Magnésium qui jouent le rôle de cofacteurs pour l'action des enzymes antioxydantes (Vannucchi *et al.*, 2007).

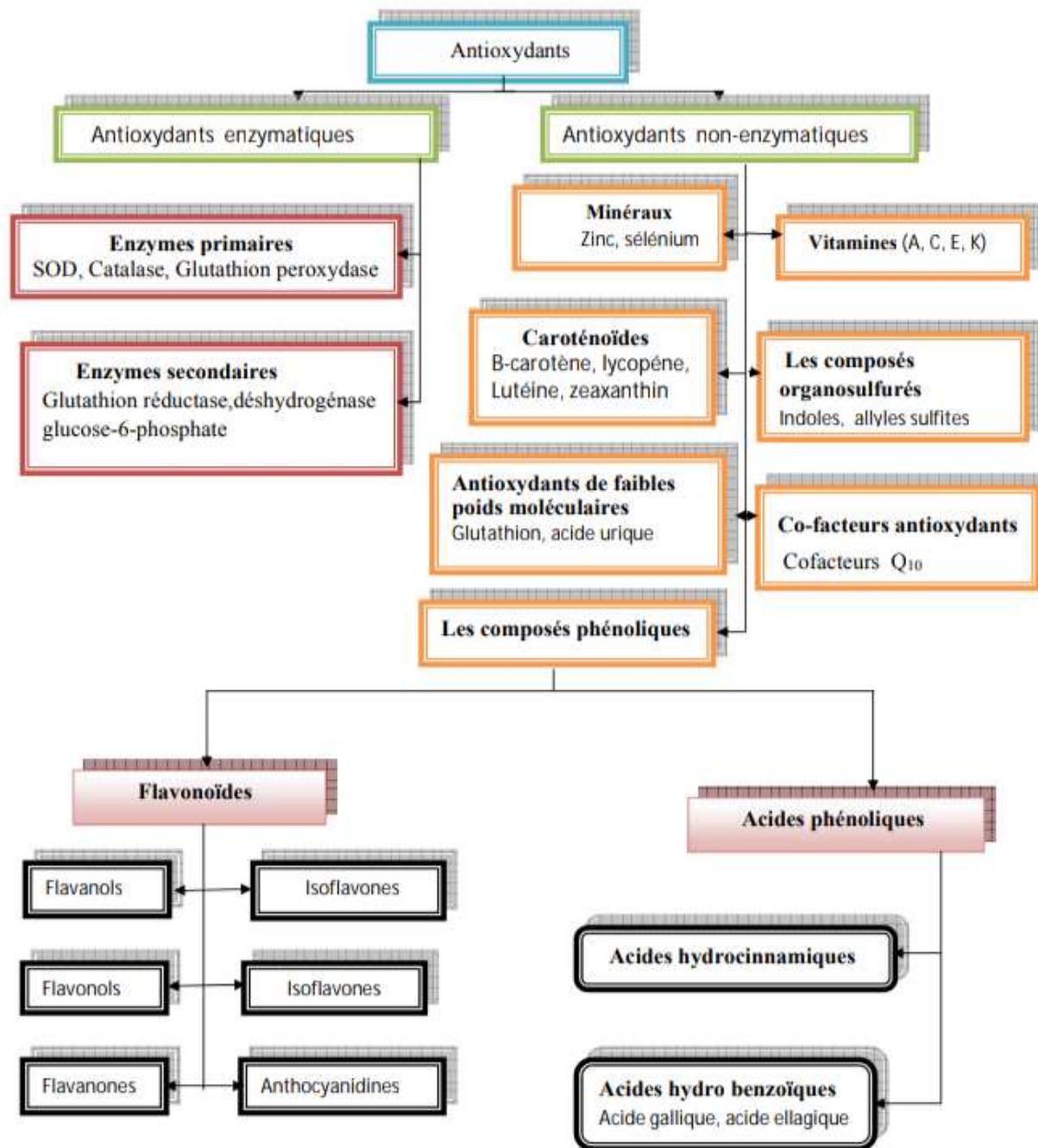


Figure 04 : Classification des antioxydants (Ratnam *et al.*, 2006)

2.2.1. Système de défense enzymatique :

Les enzymes constituent la première ligne de défense contre les radicaux libres (Parrilla-Taylor et Zenteno-Savín, 2011).

Figure 05 : Structure de la vitamine E
(Bast et Haenen, 2002)

➤ **La vitamine C :**

La vitamine C ou l'acide ascorbique (**Figure 06**) est un antioxydant hydrosoluble, connu pour son pouvoir réducteur important. Il inhibe la peroxydation des lipides dans le plasma (**Gaté et al., 1999**) et piège le radical ($O_2\cdot$) par formation du radical semi dehydroascorbate qui est réduit par le glutathion (**Ratnam et al., 2006**).

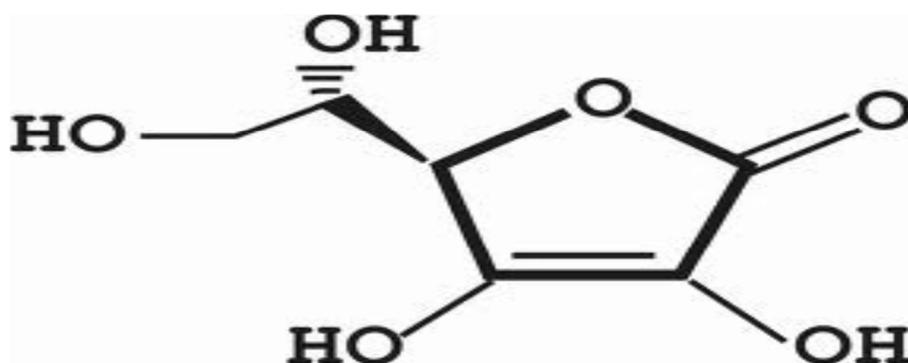


Figure 06 : Structure de la vitamine C
(Gaté et al., 1999)

➤ **Les composés phénoliques :**

Ils peuvent servir comme antioxydants (**Falleh et al., 2011**). Ils répriment la formation des espèces radicalaires par inhibition d'enzymes intervenant lors de la formation des radicaux libres (xanthine oxydase, protéine kinase C), par chélation de métaux lourds ou encore comme des donateurs d'hydrogène en phases aqueuses ou lipidiques (**Rocha-Guzman et al., 2007**).

➤ ***Chapitre 4 : Les pesticides***

1. Historique :

L'utilisation des substances chimiques pour réaliser le contrôle de la végétation remonte à plus d'un siècle, c'est en Allemagne, vers les années 1850, que la première substance herbicide voit le jour, un mélange de sel et de jus de lime était alors utilisé. Il a fallu ensuite plusieurs décennies avant de voir apparaître de nouveaux produits chimiques pour contrôler la végétation (**Fortier et al., 2005**). En outre, en 1896, les premiers herbicides sélectifs, sulfate de fer, a été trouvé pour tuer les mauvaises herbes à feuilles larges. Ensuite, en 1944, fait la première hormone à base herbicide 2,4-D disponibles (**Jesse uneke, 2007**). A la fin des années 1960, le premier cas de résistance à un herbicide est signalé et en 1968, les expressions "système de gestion intégrée des ravageurs" et "révolution verte" sont employées pour la première fois. A partir des années 1950 jusqu'à aujourd'hui, l'industrie chimique synthétise de nombreux nouveaux pesticides (**Deguine et al., 2008**).

2. Définition :

Le mot « **pesticide** » provient de l'association du mot anglais « *pest* », lequel provient du latin « *pestis* » (fléau, calamité), signifie animal, insecte, plante ou nuisible (virus, bactérie, champignon, ver, mollusque, insecte, rongeur, oiseau et mammifère) susceptibles d'être nuisible à l'homme et à son environnement et du suffixe « *-cide* » ((latin *-cida*, du verbe latin *caedo, caedere*) qui signifie tuer (**Cotonat, 1996 ; Couteux et Salaün, 2009**).

L'Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture (**FAO**) et l'Organisation Mondiale de la Santé (**OMS**) définissent le terme pesticide comme : « Toute substance prévenant ou contrôlant toute espèce de plantes ou animaux indésirables, incluant aussi les substances utilisées comme régulateur de croissance végétale, désherbage ou desséchant » (**FAO/WHO, 1998**).

3. Classification :

3.1. Classification biologique :

En se basant sur le deuxième critère qui est son action sur le parasite, on peut classer les pesticides en : insecticides, acaricides, fongicides, antibiotiques à usage agricole, herbicides, molluscicides, rodenticides, nematicides, corvicides (**Bazzi, 2010**).

4. Valeurs toxicologiques des pesticides :

4.1. La dose journalière admissible (DJA) :

La DJA est usuellement rapportée au kilo de poids corporel. C'est la dose de la substance susceptible d'être absorbée en une journée et par kilo de poids corporel par un individu sans entraîner d'effets toxiques, même si l'absorption a lieu quotidiennement toute la vie (**Leyral, et Vierling., 2007**). Elle apparaît comme comportant le moins de risques pour la santé du consommateur, la DJA étant fondée sur tous les faits connus au moment de l'évaluation du produit par la Réunion conjointe **FAO/OMS** sur les résidus de pesticides (JMPR). Elle est exprimée en milligrammes par kilogramme de poids corporel (**FAO., 1994**). La DJA pour la métribuzine a été établie à 0,013 mg/kg de poids corporel/jour (**Efsa, 2006**).

4.2. La limite maximale de résidus (LMR) :

Limite maximale Codex pour les résidus de pesticides (**LMR**), la concentration maximale du résidu d'un pesticide (exprimée en mg/kg) que la Commission du Codex Alimentaire recommande d'autoriser officiellement dans ou sur des produits alimentaires ou des aliments pour animaux (**FAO., 1994**). La LMR pour la métribuzine a été établie à 0.6 ppm pour la pomme de terre, et de 0.1 ppm pour la tomate (**Pmra., 2013**).

5. Les effets des pesticides sur l'environnement :

Les pesticides ont largement contribué à l'augmentation de la production et de la productivité agricole et à la qualité de la production végétale mais, une fois introduits dans l'environnement, ils peuvent s'accumuler dans le sol et dans l'eau et provoquer des dommages à la flore et à la faune, lorsque les concentrations dans les chaînes alimentaires deviennent assez élevées pour nuire à la faune et à la flore sauvage (**tableau 02**). Par ailleurs, les résidus des pesticides portent atteinte à la qualité des eaux potables, contaminent les aliments destinés à la consommation humaine, ont des effets négatifs sur la santé des travailleurs agricoles qui y sont directement exposés, tandis que certains pesticides contiennent des composés de bromure qui, une fois volatilisés, se transforment dans la stratosphère en gaz responsables de l'appauvrissement de la couche d'ozone (**OECD., 1999**).

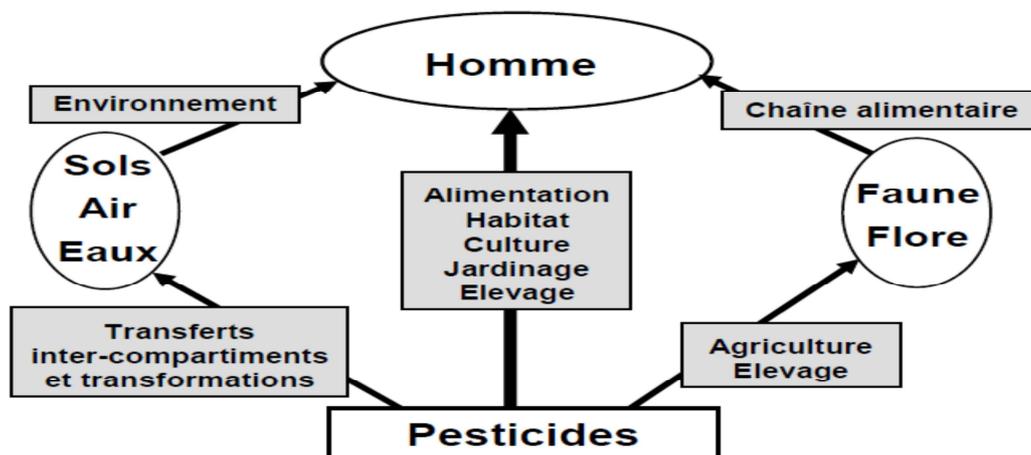
Tableau 02: les effets néfastes des pesticides sur l'environnement (Sibieude *et al.*, 1993).

Pratiques agricoles	Sols	Eaux souterraines	Eaux de surface	Flore et fone	Autres: air, bruit, paysage
Pesticides	Accumulation de pesticides et de produits de dégradation	Lessivage des résidus mobiles de pesticides et des produits de dégradation		-Effet sur la microflore du sol; résistance de certaines mauvaises herbes - Empoisonnement résistance	Evaporation ,mauvais, épandage aérien, résidus

6. Mode d'exposition des pesticides :

Les pesticides sont utilisés, non seulement dans l'agriculture, mais aussi par divers autres acteurs (industries, collectivités territoriales) ainsi qu'en usage domestique et vétérinaire. Des problèmes de résidus dans les légumes, les fruits, etc., sont aussi mis en évidence.

L'exposition aux pesticides se caractérise donc par une multiplicité des voies d'exposition, ces substances pouvant pénétrer dans l'organisme par contact cutané, par ingestion et par inhalation. La grande variété de produits rend difficile l'évaluation des expositions des populations, qu'il s'agisse de la population exposée professionnellement (agriculteurs ou manipulateurs), ou de la population générale. **La figure 07** résume les possibles modes d'exposition de l'environnement et de l'homme aux pesticides.

**Fig. 07 :** Modes d'exposition de l'homme aux pesticides (CPP, 2002).

7. Les pyréthrinoides :

7.1.Généralités :

Les pyréthrinoides sont les analogues synthétiques des pyréthrines, qui sont des substances chimiques naturelles présentes dans les fleurs de chrysanthème. Les pyréthrinoides synthétiques ont une structure et une action similaires aux pyréthrines naturelles mais, contrairement à elles, ils présentent l'avantage d'être stables à la lumière tout en gardant un pouvoir insecticide, une action plus sélective sur certaines espèces et une faible toxicité pour les mammifères. Leur apparition remonte aux années 1970, c'est-à-dire après l'interdiction des pesticides organochlorés et organophosphorés, qui s'accumulaient dans l'environnement et l'organisme humain (**fréry et al., 2013**).

Les pyréthrinoides, constituent aujourd'hui la famille d'insecticides la plus utilisés. Ils sont utilisés contre une grande variété d'insectes en agriculture, horticulture, dans le domaine forestier, en santé publique (dans les hôpitaux) et dans les résidences, Les pyréthrinoides les plus connus et utilisés commercialement sont la perméthrine, la cyperméthrine, la cyfluthrine, la deltaméthrine et le fenvalérate ; Ils se retrouvent dans l'environnement essentiellement en raison de leur usage comme insecticides. Dans l'air, ils sont rapidement détruits par le soleil (1-2 jours). Ils sont fixés fortement aux sols et peuvent être dégradés par les organismes présents dans le sol et l'eau.

Si, en général, ils sont relativement peu toxiques pour les mammifères, les pyréthrinoides sont des insecticides de synthèse très toxiques pour les organismes aquatiques et les animaux à sang froid. La plus faible toxicité chez les mammifères s'explique par une faible absorption par la peau et une transformation rapide dans l'organisme (**Bouvier, 2005**).

7.2.Classification :

La famille des pyréthrinoides compte près d'un millier de molécules réparties en deux groupes selon la molécule possède (type II) ou non (type I) un groupement cyanure (**Figure 08**) parmi les 14 molécules les plus couramment utilisées on peut citer la perméthrine la cyperméthrine et la deltaméthrine ils plusieurs isomères (2-8) chacun des principaux composés présents sur le marché les mélanges commerciaux sont généralement composés de différents isomères qui présentent des propriétés insecticides et toxicologiques différentes (**Fréry et al., 2013**).

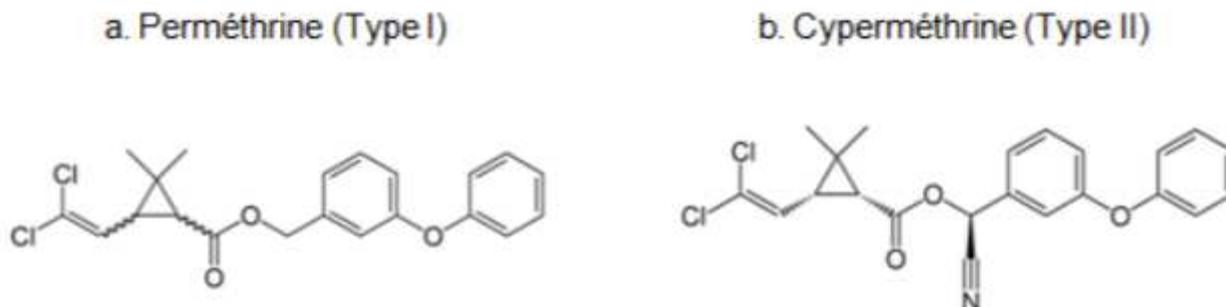


Figure 08 : Formules chimiques développées (a) d'un pyréthrianoïde de type I, la perméthrine et (b) d'un pyréthrianoïdes de type II, la cyperméthrine (**Morgan ,2012**)

7.3. Exemples sur les pyréthrianoïdes :

7.3.1. la Deltaméthrine :

La deltaméthrine (**OMS, 1998**) ou K.othrine®, ou décaméthrine, est un insecticide pyréthrianoïde de synthèse de type II très actif et ayant un large spectre d'action. Son utilisation dans le domaine de la santé publique et animale, et surtout en agriculture, semble être largement envisagée. Est un insecticide non systémique à action rapide par contact et ingestion. (**Aldridge 1990, Vijverberg et van den Bercken, 1990**).

➤ Propriétés :

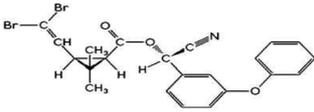
La deltaméthrine est un solide blanc inodore, Elle est presque insoluble dans l'eau (0,2 µg/l à 25°C) et soluble dans de nombreux solvants organiques notamment l'acétone, le 1,2-dichloroéthane, le diméthylsulfoxyde, l'acétate d'éthyle et le xylène.

➤ Toxicités :

La deltaméthrine (DM) est répertoriée en classe II par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) et par l'Agence de Protection de l'Environnement (EPA, USA) et dans la liste noire par la Convention de Stockholm (Green Peace) (**Utip et al., 2013**). Elle est très toxique pour les poissons et les abeilles (**EuroCom, 2002 ; HSDB, 2001 ; US EPA, 1998**). En solution, dans un solvant non aqueux, la deltaméthrine présente sa plus faible DL50 de 19mg/kg par voie orale chez la souris et d'environ 130 mg/kg/j chez le rat (**IPCS, 1990**). La toxicité de DM par voie cutanée est faible ; la DL50 correspondante est supérieure à 800mg/kg chez le rat et supérieure à 2000 mg/kg chez le lapin (**INRS, 2016**). L'intoxication aiguë se manifeste chez le rat et la souris par les signes suivants : hypersalivation, diarrhée, dyspnée, faiblesse, défaut

de coordination motrice, hypotonie, tremblements, mouvements cholériformes, tachycardie, difficultés respiratoires et convulsions cloniques. Les paralysies des muscles respiratoires sont susceptibles de conduire à la mort. La sévérité des symptômes est corrélée à la concentration de DM dans le cerveau (He et al., 1989 ; INRS, 2016). La deltaméthrine provoque une salivation excessive, secousses cloniques, mouvements involontaires, convulsions toniques et cloniques. On a noté aussi des altérations neurologiques avec démyélinisation (Scassellati et al., 1994 ; Toumi, 2013).

Tableau 03 : Principales propriétés physico-chimiques et toxicologiques de deltaméthrine (INRS, 2007 ; Toumi, 2013 ; Shivanoor et David, 2014).

Nom chimique :	R-3-(2,2-dibromovinyl)-2,2-diméthyl-cyclopropane carboxylate de (S)- α -cyano-3-phénoxybenzyle.
Structure chimique :	
Formule chimique :	C ₂₂ H ₁₉ Br ₂ NO ₃
Masse molaire :	505,20 g/mole
Point de fusion :	90 °C
Solubilité dans l'eau :	≤0.0002 mg/l à 25°C
Etat physique :	Cristaux blancs
DJA :	100 à 150µg/kg/j
Effets toxiques	Médiatement toxique (irritation, inflammation, ...)

7.3.2. la lambda-cyhalothrine :

La lambda-cyhalothrine est un Pyréthriinoïde de synthèse utilisé pour contrôler une large gamme de ravageurs à savoir les lépidoptères, les hémiptères, les diptères, et les coléoptères (Bao et al., 2007). Elle est un important outil utilisé en santé pour contrôler les cafards, les moustiques, et les mouches, qui peuvent agir comme des vecteurs de maladies. (Velmurugan et al., 2007). (Figure 09).

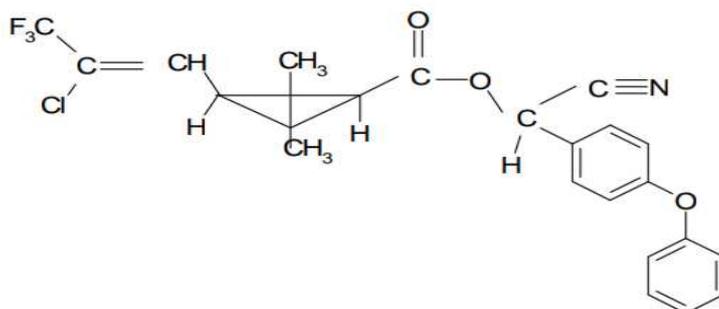


Figure09 : Lambda-cyhalothrine (Velmurugan *et al.*, 2007).

➤ Propriétés

La lambda-cyhalothrine est un insecticide pyréthriinoïde de synthèse de type II, dont les utilisations en agriculture sont de plus en plus importantes (Ansari *et al.*, 2012; Fetoui *et al.*, 2009; Iyyadurai *et al.*, 2014). Cette substance active est constituée de deux des quatre formes énantiomères de la cyhalothrine. Il s'agit d'une molécule à large spectre contre les insectes ravageurs des cultures (Fetoui *et al.*, 2009).

Il a été déterminé, à partir d'études chroniques menées avec la cyhalothrine et la lambda cyhalothrine, que la pharmacocinétique, le métabolisme et la toxicité de la lambdacylhalothrine et la cyhalothrine sont similaires (Anadon *et al.*, 2006). En effet, ces deux composés ont la même structure chimique, mais ils diffèrent seulement par la composition des stéréo-isomères présents. Ils partagent ainsi les mêmes propriétés physicochimiques et biologiques (Moser *et al.*, 2016).

➤ Toxicité de la lambda-cyhalothrine :

Comme les autres pyréthriinoïdes, la lambda-cyhalothrine est une molécule à potentiel neurotoxique non seulement pour les insectes, mais aussi pour les mammifères (Anadon *et al.*, 2006; Ansari *et al.*, 2012; Aouey *et al.*, 2017; Fetoui *et al.*, 2009). Cependant, cette substance active est plus toxique chez les insectes que chez les humains, étant donné la différence inter-espèces dans la sensibilité des canaux sodiques et des différences de masse et température corporelle. (Bradberry *et al.*, 2005). La toxicité de la lambda cyhalothrine chez les animaux a été étudiée abondamment ces dernières années, parce que les sujets exposés à ces insecticides ont montré des changements au niveau du fonctionnement du cerveau impliquant les systèmes dopaminergiques, cholinergiques et sérotoninergiques. (Hossain *et al.*, 2005).

✓ Neurotoxicité :

L'effet neurologique de la lambda-cyhalothrine a été étudié chez des rats mâles Long Evans à partir de tests de l'activité motrice. **Wolansky et al. (2006)** ont étudié l'effet d'un mélange d'insecticide de type I et II afin de caractériser une relation dose- réponse de l'apparition des effets reliés à l'activité motrice. Il a aussi été documenté, qu'une dose de 3-10 mg/kg de lambda cyhalothrine diminuait l'activité motrice de rats exposés de 50 – 60 % (**Wolansky et al., 2006**). La lambda-cyhalothrine ayant le groupe α -cyano, présente les mêmes effets comportementaux que ceux des pyréthriinoïdes de type II, y compris de la salivation, des tremblements, ainsi que la diminution de l'activité motrice (**Righi et Palermo-Neto, 2003; Weiner et al., 2009; Wolansky et al., 2006**).

Plusieurs études ont été menées chez différentes espèces animales. En particulier, **Weiner et al. (2009)** ont documenté la toxicité aiguë d'un mélange de douze produits commerciaux de la famille des pyréthriinoïdes dont la lambda-cyhalothrine, suite à une exposition orale aiguë chez des rats Sprague-Dawley. Les rats ayant été exposés à une dose de 10-20 mg/kg de lambda-cyhalothrine présentaient des signes de salivation, d'altération de la fonction motrice, de la coordination et des tremblements. (**Weiner et al., 2009**). De plus, l'étude de **Moser et al. (2016)** a confirmé aussi l'observation de tremblements chez les rats exposés par voie orale à des doses élevées de chaque isomère de la cyhalothrine, soit 6 mg/kg pc pour la lambda-cyhalothrine et 3 mg/kg pc pour la gamma-cyhalothrine. La salivation a été observée chez les groupes de rats exposés à des doses inférieures à 3mg/kg pc. Par ailleurs, cette étude a montré une corrélation entre les concentrations de la lambda-cyhalothrine dans le plasma et les tissus et la diminution de l'activité motrice (**Moser et al., 2016**). Cependant, des études récentes ont montré un effet inverse des pyréthriinoïdes sur le neurodéveloppement. En plus des effets neurotrophiques, il a été rapporté que les pyréthriinoïdes augmentaient la densité et la longueur de la colonne vertébrale.

Partie pratique

- *Chapitre 1 : Matériels et méthodes*
- *Chapitre 2 : Résultats et discussions*

➤ ***Chapitre 1 : Matériels et méthodes***

Matériels et méthodes

1. Matériel biologique:

1.1. Matériel animal :

Nous avons utilisé 32 souris blanches mâles et femelles *Mus musculus* L de la souche BALB/C provenant de l'institut pasteur d'Alger. Agés de 2-3 semaines, d'un poids vif moyen de 25 à 38 g. Ce sont des mammifères de l'ordre des rongeurs et de la famille des Muridés, largement utilisés dans divers domaines de recherche (**Tableau 04**). Ces souris ont été soumises à une période d'adaptation 15 jours environ, aux conditions de l'animalerie; à une température de $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}$ et une photopériode naturelle.

Tableau 04 : Classification des souris (**Orsini et al. 1983**).

Règne	Animale
Embranche	Vertébrés
Classe	Mammifère
Ordre	Rongeurs
Sous-ordre	Myomorphes
Famille	Muridés
Genre	Mus
Espèce	<i>Mus musculus</i> L. 1753
Nom commun	Souris

Les souris sont mises dans des cages en polyéthylène spéciaux (**figure 10**) qui sont tapissées d'une litière constituée de copeaux de bois. Les cages ont été nettoyées et la litière changée tous les jours jusqu'à la fin de l'expérimentation.



Figure 10 : Cages de souris (photo personnelle 2019)

1.2. Matériel végétal

➤ Préparation de l'extrait hydro-méthanolique

50 g de poudre fine d'écorce de grenadier ont été ajoutés à 350 ml de méthanol dans un Erlenmeyer rodé et mélangé puis mélangés dans 150 ml d'eau distillée. Le mélange est mis sous macération pendant 24h sous agitation. L'extrait obtenu est ensuite refroidi puis filtré à température ambiante, le filtrat est évaporé à sec à 46°C à l'aide d'un vaporisateur rotatif. Puis l'extrait est vidé dans une boîte de Pétri et placé dans l'étuve à 40°C pendant 48 h.

➤ Rendement

Le rendement d'extraction a été estimé par rapport au poids de l'extrait brut et de la masse de matières végétales sèches, il est exprimé en pourcentage et calculé selon la formule suivante :

$$\text{RE (\%)} = \frac{\text{PBG} - \text{PBV}}{\text{PP}} \times 100$$

RE : rendement d'extraction en pourcentage.

PBE : poids des boîtes pleines après séchage (contient l'extrait brut) en gramme.

PBV : poids des boîtes vides en gramme.

PP : poids des plantes sèches en gramme.

1.3. Matériel chimique :

- **La Deltamethrine** : La deltamethrine (Deltamethrin®) fabriqué par **Averstar industrial Co., Ltd, Sz, La Chine.**
- **La lambda-cyhalothrine** : un insecticide pyréthroïde synthétique avec le nom commercial 'KARATE', provenait de ZENECA Agrochemicals, Royaume-Uni (2,5%).
- **Choix des doses** :
 - **Pesticide 1** : Deltamethrine (DM) de dose 50 mg/kg/j selon (**Samiran et al., 2010**).
 - **Pesticides 2** : Lambda-cyhalothrine (LCT) avec une dose de 3,8 mg/kg/j selon (**Samiran et al., 2010**).
 - **Extrait** : Solution d'extraction brut de la *Punica granatum* (EXT) de dose 50 mg/kg/j selon (**Mohamed et al., 2013**).

2. Traitement des souris :

Dans notre étude, nous avons utilisé deux types des pesticides la Deltamethrine et Lambda-cyhalothrine, seuls ou en mixture, et un extrait hydro-méthanolique, administrés subchroniquement par voie orale pendant 15 jours.

Les souris ont été repartis en 8 lots de 4 souris chacun (**figure 11**), il s'agit de :

- **Lots n°1**: contient 04 souris comme témoin ; gavage d'eau minérale seulement.
- **Lots n°2**: contient 04 souris pour le traitement par l'extrait de dose 50 mg/kg/j.
- **Lots n°3**: contient 04 souris pour le traitement par deltamethrine de dose 50 mg/kg/j et lambda-cyhalothrine de dose 3,8 mg/kg/j et l'extrait de dose mg/kg/j.
- **Lots n°4**: contient 04 souris pour le traitement par lambda-cyhalothrine 3,8 mg/kg/j et l'extrait. **Lots n°5**: contient 04 souris pour le traitement par deltamethrine de dose 50 mg/kg/j et lambda-cyhalothrine 3,8 mg/kg/j.
- **Lots n°6**: contient 04 souris pour le traitement par deltamethrine de dose 50 mg/kg/j. et l'extrait de dose 50 mg/kg/j.
- **Lots n°7**: contient 04 souris pour le traitement par deltamethrine de dose 50 mg/kg/j.
- **Lots n°8**: contient 04 souris pour le traitement par lambda-cyhalothrine de dose 3,8 mg/kg/j.



Figure 11 : Gavage des pesticides à souris (photo personnelle 2019)

3. Mesure de poids des souris :

La mesure de poids des souris témoins et traités a été effectuée chaque 3 jours, à l'aide d'une balance électronique, avant chaque gavage afin de déduire la dose de pesticides à administrer et de connaître l'effet de ces derniers sur le poids des souris.

4. Sacrifices et prélèvements des organes :

Après 15 jours de traitement les 8 lots sont sacrifiés. Les animaux sacrifiés ont été pesés puis ouverts centralement pour le prélèvement de certains organes (**Figure 12**). Les poumons ont été récupérés et rincés dans une solution de chlorure de sodium (NaCl) à 0.9 %, puis pesés à l'aide d'une microbalance pour ensuite être mis dans des boîtes de prélèvement. Les poumons ont été conservés à -20° pour dosage des paramètres étudiés à savoir MDA, GPx, Catalase, protéine, lipide, glucide.

Le matériel utilisé pour le sacrifice des animaux et la dissection est cité dans l'annexe.



Figure 12 : Sacrifice et prélèvement des organes (photo personnelle 2019)

La Figure13 schématise les différentes étapes du protocole expérimental utilisé.

➤ **Poids relatif des poumons (PRp) :**

Le poids relatif des poumons (PRp) est calculé selon le rapport entre le poids des poumons et le poids total des souris suivant la formule suivante :

$$\mathbf{PRp\ (\%) = (Pp/PC) \times 100}$$

PRp : poids relatif des poumons (%).

PC : poids corporel (g).

Pp : poids des poumons (g).

5. Préparation de l'homogénats des organes :

8 mg de tissu (poumons) de chaque souris des différents lots étudiés, a été broyée avec 1 ml de solution tampon phosphate salin (TBS), composée de, Tris 50 mm, NaCl 150 mm avec un pH 7.4, puis centrifugée à 3000 tours/min pendant 15 minutes, le surnageant obtenu est conservés à -20°C en vue d'effectuer le dosage des paramètres du stress oxydatif.

6. Préparation des solutions :

Le protocole de préparation des solutions pour dosage des différents paramètres est illustré dans l'annexe.

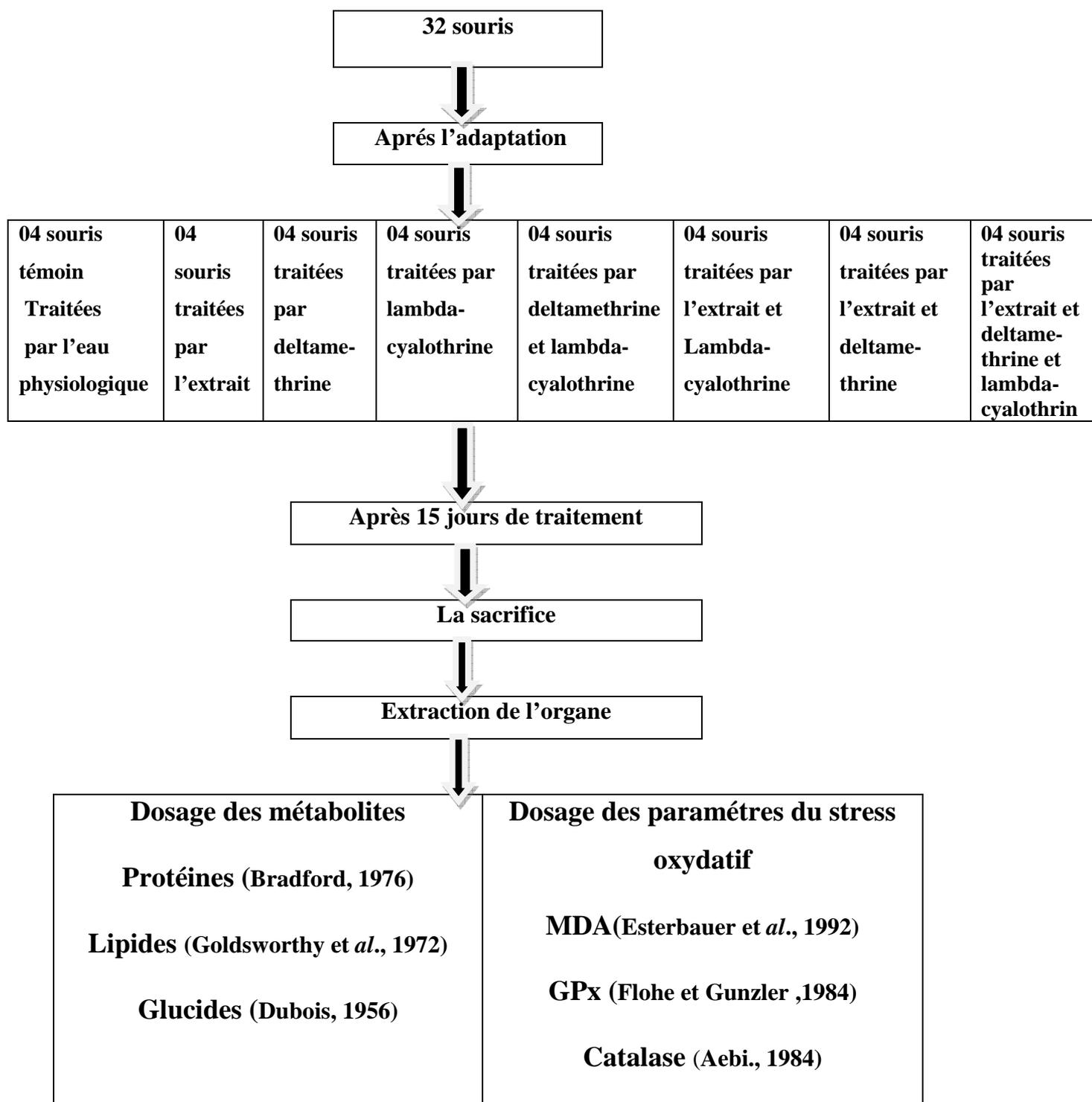


Figure 13 : Les différentes étapes du protocole expérimental

7. Evaluation des paramètres biochimiques et enzymatiques :

➤ Dosage des glucides :

Le dosage des glucides solubles totaux a été fait selon la méthode de **Dubois, 1956**. L'extraction des sucres solubles consiste à mettre 100µl d'homogénat dans des tubes à essai puis à ajouter 2ml d'éthanol à 80%, le tout est laissé 48h. Le dosage se fait par évaporation totale de l'alcool en mettant les tubes à essai dans un bain marie à 70°C. Après refroidissement, on complète le volume de chaque tube à essai à 20ml avec de l'eau distillée ensuite on prélève 1ml de la solution et on ajoute 1ml de phénol à 5% en prenant soin de bien agiter, puis on ajoute 2ml d'acide sulfurique concentré dans des tubes déposés préalablement dans un bain de glace. Enfin le tout est laissé se reposer pendant 25min, puis on procède à la lecture à une longueur d'onde de 490nm. Le calcul des concentrations réelles se fait par l'équation déduite de la gamme d'étalonnage préparé à partir d'une solution mère de glucose.

➤ Dosage des lipides :

Les lipides tissulaires sont évalués selon la méthode (**Goldsworthy et al., 1972**), on utilise 200µl d'homogénat dans 5ml de l'acide trichloroacétique 20% (TCA), on broie et on filtre ce mélange ; et directement on applique une centrifugation à 5000t/min pendant 10min. Le culot est gardé dans un tube contenant 1ml du mélange Ether/Chloroforme, et après centrifugé ce mélange à 5000t/min pendant 10min, on prélève 100µl du surnageant, auquel on ajoute 1ml de l'acide sulfurique et on met après agitation les tubes dans un bain marie à 100°C pendant 10min. Après refroidissement, on prélève encore une fois au moyen d'une micropipette 200µl de l'extrait auquel on ajoute 2.5ml du mélange sulfophosphanillique à 85% (0.38g vanilline+195ml acide orthophosphorique+55ml H₂O) et laissé ce mélange 30min à l'obscurité, la lecture à une longueur d'onde 530nm. Le calcul des concentrations réelles se fait à partir de l'équation déduite de la gamme d'étalonnage réalisée à partir d'une solution mère préparée en utilisant de l'huile de tournesol (**Annexes**).

➤ Dosage des protéines :

La méthode utilisée pour le dosage des protéines est celle de **Bradford, 1976** qui utilise la BSA comme standard, sur le même échantillon utilisé pour doser les lipides, on récupère le culot issu de la deuxième centrifugation auquel on a ajouté 1ml du NaOH (0.1N) et on agite énergétiquement pour la dissolution des protéines. Après, on prélève, au moyen d'une micropipette, un volume de 100µl auquel on ajoute 4ml du réactif BBC (Bleu Brillant de Coumassie) (50mg BBC +50ml d'acide orthophosphorique à 85% et on complète à 500ml

avec l'eau distillée). Ainsi une couleur bleue se développe et on passe directement les échantillons pour lecture à une longueur d'onde 595nm. Le calcul des concentrations se fait par l'équation déduite de la gamme d'étalonnage réalisé à partir d'une solution d'albumine de sérum de bœufs (**Annexes**).

➤ **Dosage de malondialdéhyde (MDA) :**

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 d'absorption à 530 nm. (**Figure 14**).

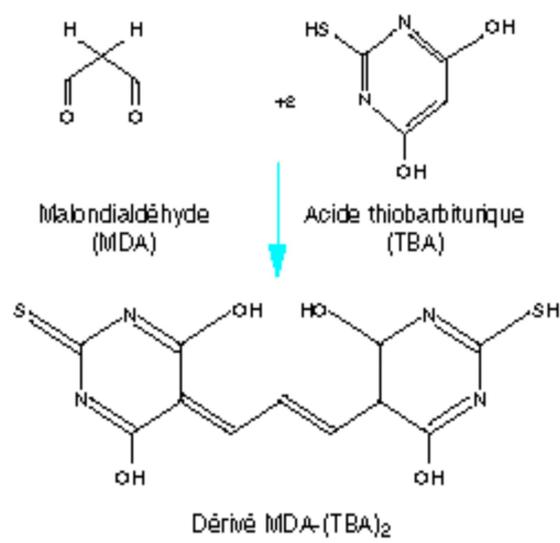


Figure 14: Réaction du dialdéhyde malonique avec l'acide thiobarbiturique .

La procédure expérimentale du dosage, est la suivante :

- Prélever 375 µl de l'homogénat (surnageant).
- Ajouter 150 µl de la solution tampon TBS (Tris 50 mM, NaCl 150 mM pH 7.4).
- Ajouter 375 µl de la solution TCA-BHT (TCA 20%, BHT 1%)
- Vortexer et Centrifuger à 1000 tours/min pendant 10 min.
- Prélever 400 µl du surnageant.
- Ajouter 80 µl du HCl 0.6 M.

- Ajouter 320 µl de la solution Tris-TBA (Tris 26 mM, TBA 120mM).
- Mélanger et incuber au bain marie à une température de 80°C pendant 10 minutes.

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

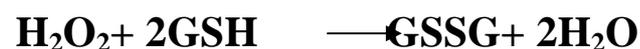
La concentration du MDA est calculée selon la loi de **Beer-Lambert** (DO = E.C.L) :

$$C \text{ (nmol/mgdeprotéine)} = DO \cdot 10^6 / \epsilon \cdot L \cdot X \cdot Fd$$

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

➤ **Dosage de l'activité enzymatique du glutathion peroxydase (GPx) :**

L'activité enzymatique du 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 (H₂O₂) en présence de glutathion réduit (GSH), ce dernier est transformé en (GSSG) sous l'influence de la GPx selon la réaction suivante :



Pour cela que, nous avons procédé aux étapes suivantes :

- Prélever 0.2 ml de l'homogénat (surnageant).
- Ajouter 0.4 ml de GSH (0.1 mM).
- Ajouter 0.2 ml de la solution tampon TBS (Tris 50 mM, NaCl 150 mM pH 7.4).
- Incuber au bain marie à 25°C, pendant 5 min.
- Ajouter 0.2ml de H₂O₂ (1.3 mM) pour initier la réaction, laisser agir pendant 10 minutes.
- Ajouter 1 ml de TCA (1%) pour arrêter la réaction.
- Mettre le mélange dans la glace pendant 30 minutes.
- Centrifuger durant 10 minutes à 3000 tours /minutes.

- Prélever 0.48 ml du surnageant.
- Ajouter 2.2 ml de la solution tampon TBS.
- Ajouter 0.32 ml de DTNB (1.0 mM)
- Mélanger et après 5 minutes lire les densités optiques à 412 nm.

La détermination de l'activité enzymatique de la GPx se fait à l'aide de la formule suivante :

$$\text{GPx } (\mu\text{mol GSH/mg protéine}) = (\text{DO échantillon} \times \text{DO étalon}) \times 0.04 / \text{DO étalon}$$

- DO échantillon : Densité optique de l'échantillon.
- DO étalon : Densité optique de l'étalon.
- 0.04 : Concentration de substrat (GSH).

➤ **Dosage de la catalase :**

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 (H₂O₂) toxique pour la cellule en eau et en oxygène (Aebi., 1984).



- Prélever 20 µl de l'homogenat.
- Ajouter 780 µl (100 mM) de tampon phosphate pH 7.4, et 200µl d'H₂O₂ (500mM)

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

$$\text{Activité } ((\mu\text{mol de H}_2\text{O}_2/\text{min})/\text{mg}) = \Delta D_0 \times d / \epsilon \times X \times L \times 0,02$$

- **ΔD₀**: Variation de la densité optique par minutes, c'est-à-dire pour :
- **AI** (Absorbance initiale) : 15 s
- **AF** (Absorbance finale) : 1min
- On fait : (AI - AF) × 4/3 par min
- **d** : dilution de l'échantillon au début

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

8. Etude statistiques :

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne (moyen \pm écart-type), les comparaisons entre les groupes sont réalisées par une analyse de variance (one-way ANOVA). L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel Minitab® 17.1. La signification de différence entre le lot témoin et les lots traités est vérifiée en utilisant le test de *Dunnet*

-**p>0,05** = la différence n'est pas significative.

-(*): **0,05>p>0.05**= la différence est significative.

-(**): **0,01>p>0.01**= la différence est hautement significative.

-(***) : **p<0.001**= la différence est très hautement significative.

➤ ***Chapitre 2 : Résultats et discussions***

Résultat

1. Effets de pesticides et l'extrait hydro-méthanolique sur les paramètres de la croissance (Poids relatif et gain de poids) chez les souris :

Les résultats obtenus lors de l'évaluation des paramètres de croissance en terme de poids relatif, le gain de poids durant les 15 jours de traitement des différents groupes de souris par la Deltaméthrine, Lambda-cyhalothrine, leur mixture et l'extrait hydro-méthanolique seul ou associé avec les pesticides sont illustrés par les figures 15 et 16.

1.1. Poids relatif :

Les résultats obtenus suite à l'évaluation du PRp montrent une augmentation significative ($0,05 > p > 0,05$) du poids relatif des poumons chez le groupe traité par la DM+LCT, LCT et EXT+LCT en comparaison avec le groupe témoin, et significative du groupe traités par le DM et le groupe traités par DM+EXT+LCT par rapport aux témoins. Alors que pas de différence par rapport à les groupes traités par l'EXT seul ou associé avec le DM par rapport aux témoins. (Figure 15).

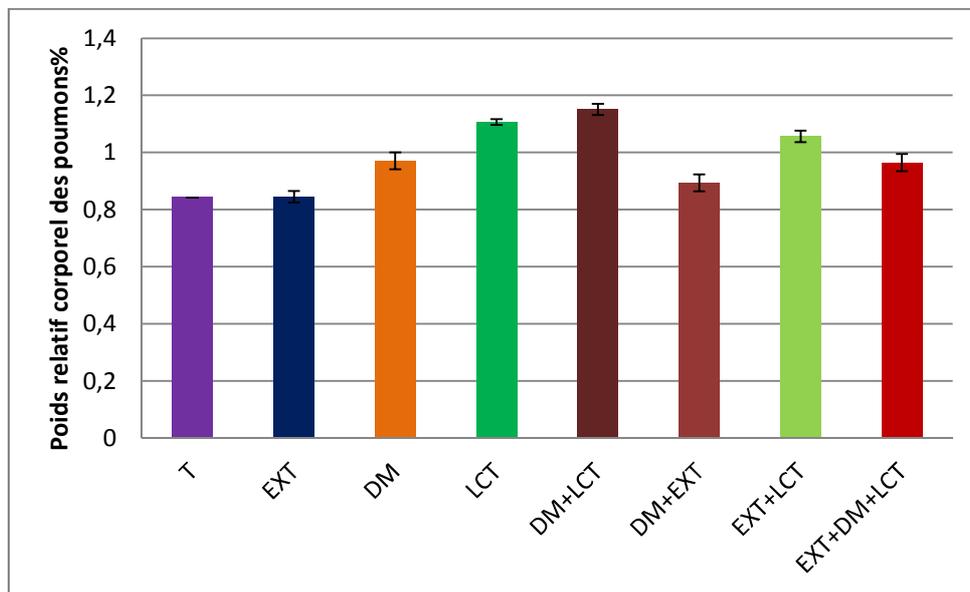


Figure 15 : Evolution du poids relatif des poumons (PRp) chez les souris traitées durant 15 jours par les pesticides et l'extrait hydro-méthanolique.

EXT : extrait (*punica granatum*). DM : deltaméthrine. LCT : lambda-cyhalothrine.

1.2. Gain de poids :

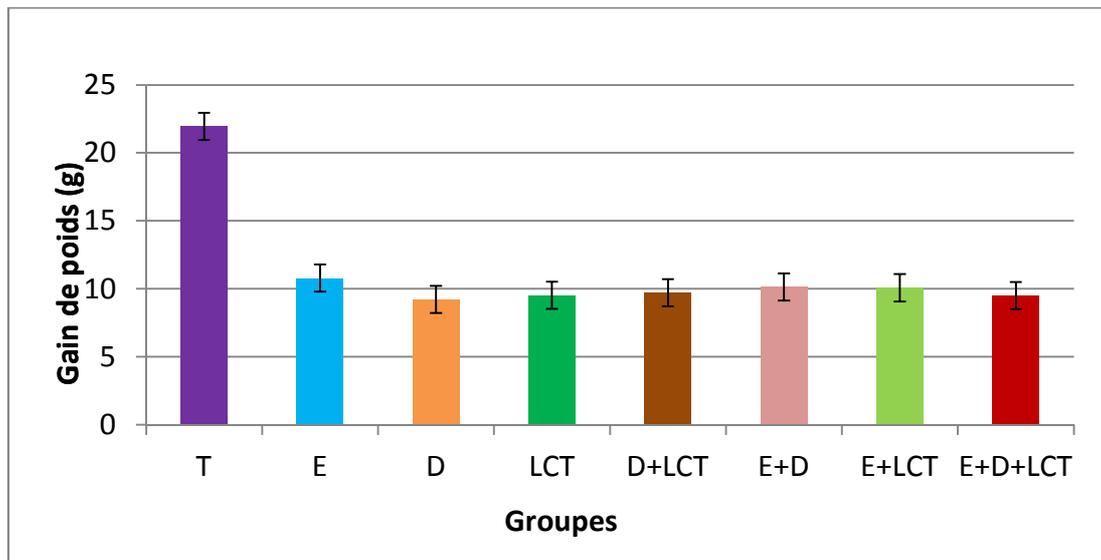


Figure 16 : Evolution du gain de poids corporel (GP) chez les souris témoins et traités après 15 jours de traitement par les pesticides et l'extrait hydro-méthanolique.

EXT : extrait (*punica granatum*). **DM :** deltaméthrine. **LCT :** lambda-cyhalothrine.

Les résultats de l'évaluation du gain de poids, présentés dans **la figure 16**, montrent une diminution significative du poids corporel chez les groupes de souris traités par la LCT, la DM et aussi leur combinaison et la mixture EXT+DM+LCT par rapport au groupe témoin. Ce résultat est Presque identique pour le lot traité par l'EXT.

2. Étude des paramètres biochimiques et enzymatiques :

2.1. Effet des pesticides et l'extrait hydro-méthanolique sur les paramètres biochimiques chez les souris :

2.1.1. Taux des protéines :

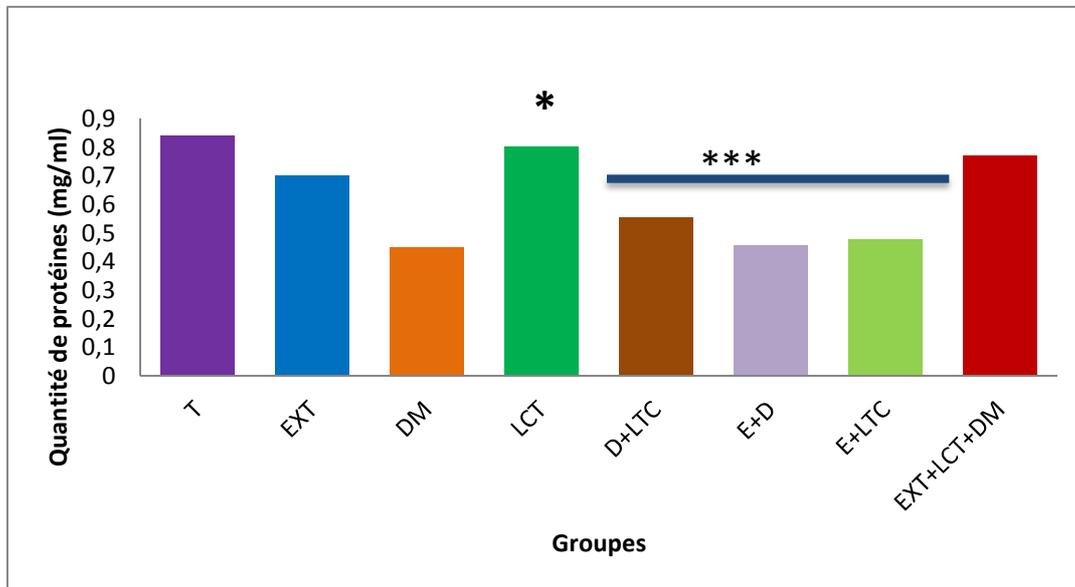


Figure 17: Variation de teneur en protéines (mg/ml) chez les souris traitées durant 15 jours par les pesticides et l'extrait hydro-méthanolique.

EXT : extrait (*Punica granatum*). **DM :** deltaméthrine. **LCT :** lambda-cyhalothrine.

- $p > 0,05$ = la différence n'est pas significative.

-(*): $0,05 > p > 0,05$ = la différence est significative.

-(**): $0,01 > p > 0,01$ = la différence est hautement significative.

-(***) : $p < 0,001$ = la différence est très hautement significative.

Les résultats (**Figure 17**) obtenus montrent une diminution très hautement significative ($p < 0,001$) du taux des protéines totales des poumons chez les souris traitées par DM et DM+LCT et EXT+DM et EXT+LCT comparés au témoin. Ces mêmes résultats montrent également un état de stabilité du taux de protéines chez les groupes traités par EXT, LCT et mixture EXT+DM+LCT, par rapport au groupe témoin.

2.1.2. Taux des lipides :

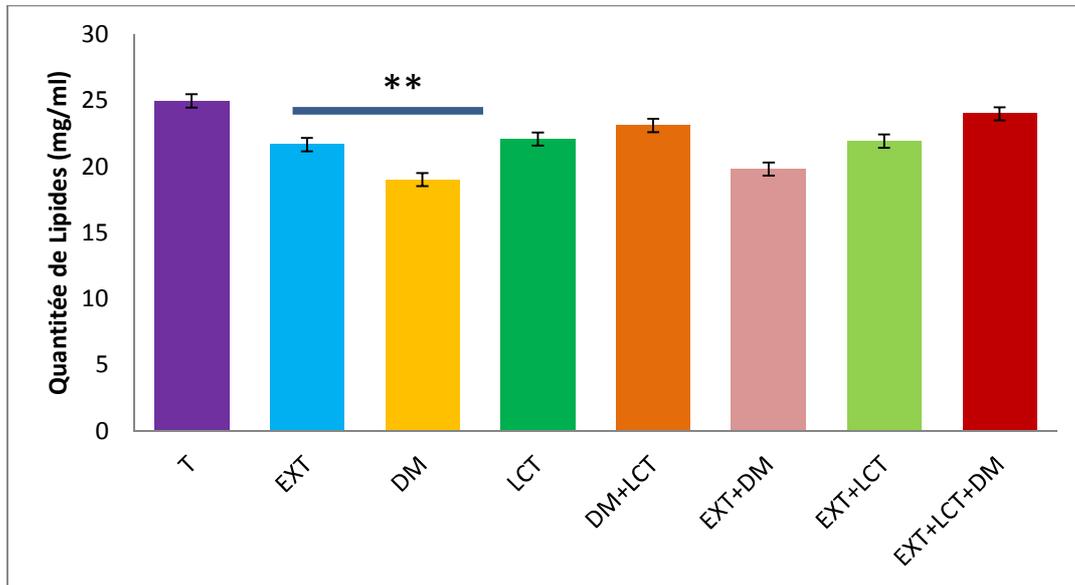


Figure 18: Variation de teneur en lipides (mg/ml) chez les souris traitées durant 15 jours par les pesticides et l'extrait hydro-méthanolique.

EXT : extrait (*punica granatum*). **DM :** deltaméthrine. **LCT :** lambda-cyhalothrine.

- $p > 0,05$ = la différence n'est pas significative.

-(*) : $0,05 > p > 0,05$ = la différence est significative.

-(**) : $0,01 > p > 0,01$ = la différence est hautement significative.

-(***) : $p < 0,001$ = la différence est très hautement significative.

Les résultats obtenus montrent une diminution hautement significative (**0,001**) du taux des lipides des poumons chez le groupe DM et le groupe EXT et DM+LCT et le groupe EXT+DM et EXT+LCT+DM et le groupe EXT+LCT comparés au témoin. Ces mêmes résultats montrent également un état de stabilité dans la teneur de lipide chez les groupes traités par, LCT par rapport au groupe témoin (**Figure 18**).

2.1.3. Taux de glucose :

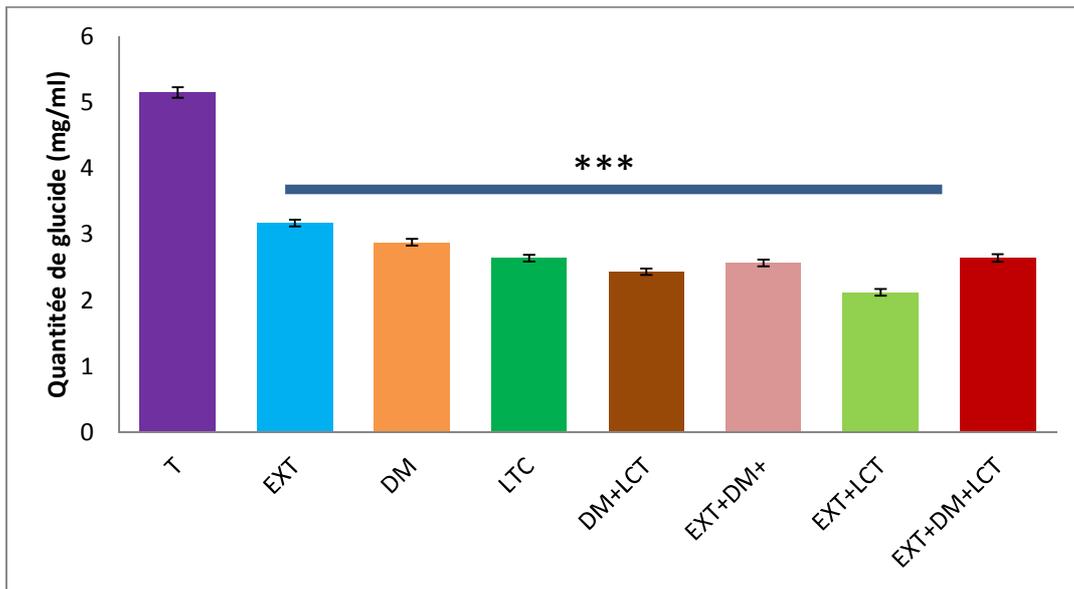


Figure 19: Variation de teneur en glucose (mg/ml) chez les souris traitées durant 15 jours par les pesticides et l'extrait hydro-méthanolique.

EXT : extrait (*punica granatum*). **DM :** deltaméthrine. **LCT :** lambda-cyhalothrine.

- $p > 0,05$ = la différence n'est pas significative.

-(*): $0,05 > p > 0,05$ = la différence est significative.

-(**): $0,01 > p > 0,01$ = la différence est hautement significative.

-(***) : $p < 0,001$ = la différence est très hautement significative.

Les résultats obtenus montrent une diminution très hautement significative ($p < 0,001$) du taux des glucides des poumons chez tous les groupe comparés au témoin. (**Figure 19**).

2.2. Effet des pesticides et l'extrait hydro-méthanolique sur les paramètres enzymatiques chez les souris :

2.2.1. Effet des pesticides et l'extrait hydro-méthanolique sur la teneur de malondialdéhyde (MDA) :

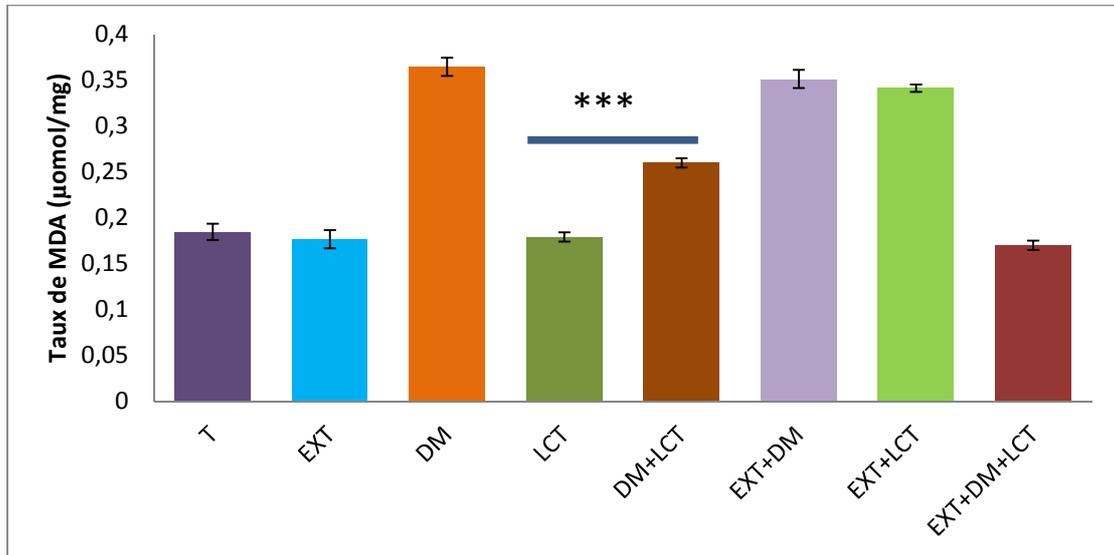


Figure 20: Taux de MDA (µmol/mg) chez les souris traités durant 15 jours par les pesticides et l'extrait hydro-méthanolique.

EXT : extrait (*punica granatum*). **DM :** deltaméthrine. **LCT :** lambda-cyhalothrine.

- $p > 0,05$ = la différence n'est pas significative.

-(*): $0,05 > p > 0,01$ = la différence est significative.

-(**): $0,01 > p > 0,001$ = la différence est hautement significative.

-(***) : $p < 0,001$ = la différence est très hautement significative.

Nos résultats montrent une augmentation significative ($0,05 > p > 0,01$) du taux de MDA chez les groupes traités par la DM, EXT+DM, et EXT+LCT, DM+LCT par rapport au groupe témoin (**Figure 20**), et les groupes traités par EXT et par LCT et leur mixture avec le DM ont enregistré une diminution significative du taux de MDA par rapport au témoin.

2.2.2. Effet des pesticides et l'extrait hydro-méthanolique sur les variations de l'activité de la glutathion peroxydase GPx :

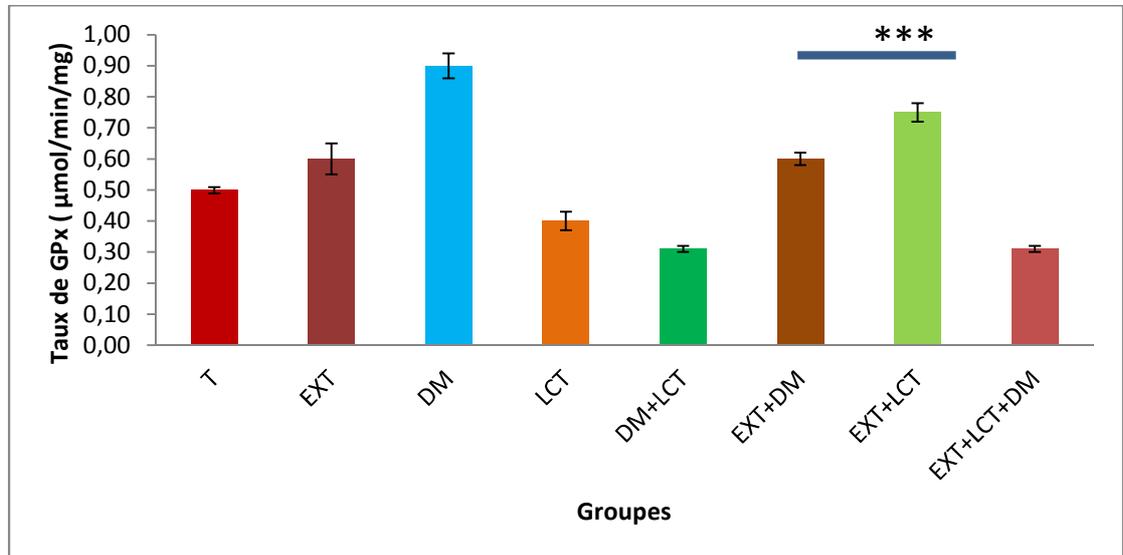


Figure 21: Activité de GPx (µmol/min/mg) chez les souris traitées durant 15 jours par les pesticides et l'extrait hydro-méthanolique.

EXT : extrait (*punica granatum*). DM : deltaméthrine. LCT : lambda-cyhalothrine.

- $p > 0,05$ = la différence n'est pas significative.

-(*) : $0,05 > p > 0,01$ = la différence est significative.

-(**) : $0,01 > p > 0,001$ = la différence est hautement significative.

-(***) : $p < 0,001$ = la différence est très hautement significative.

Les résultats montrent une augmentation très hautement significative ($p < 0,001$) de l'activité de GPx (**Figure 21**) chez les groupes traités par la DM et EXT+LCT par rapport au groupe témoin. Par contre, les résultats ne montrent pas une variation significative chez les autres groupes traités.

2.2.3. Effet des pesticides et l'extrait hydro-méthanolique sur la teneur de Catalase

(CAT) :

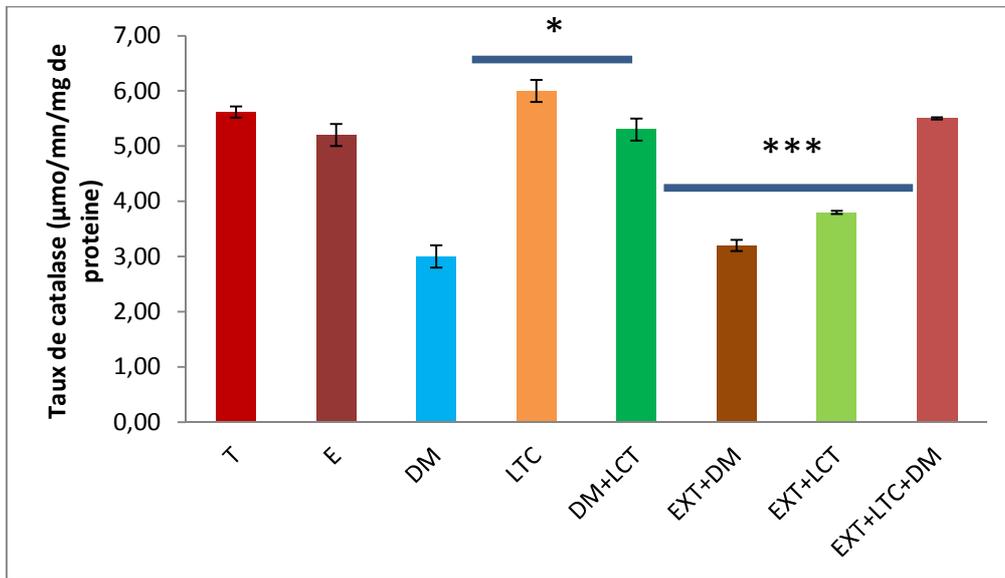


Figure 22: Taux de CAT ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$) chez les souris traités durant 15 jours par les pesticides et l'extrait hydro-méthanolique.

EXT : extrait (*punica granatum*). DM : deltaméthrine. LCT : lambda-cyhalothrine.

- $p > 0,05$ = la différence n'est pas significative.

-(*) : $0,05 > p > 0,01$ = la différence est significative.

-(**) : $0,01 > p > 0,001$ = la différence est hautement significative.

-(***) : $p < 0,001$ = la différence est très hautement significative.

Les résultats obtenus montrent une diminution très hautement significative ($p < 0,001$) du taux de CAT des poumons (**Figure 22**) chez les groupes DM et EXT+DM, EXT+LCT comparés au témoin. Ces mêmes résultats montrent également une diminution significative ($0,05 > p > 0,01$) chez le groupe DM+LCT par rapport au groupe témoin.

Discussions :

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

Le but de ce travail était en premier lieu la mise en évidence d'une éventuelle toxicité des deux pesticides (deltaméthrine et lambda-cyhalothrine) sur les poumons des souris ainsi que l'effet de l'extrait des *Punica granatum* en terme de paramètres de croissance, paramètres métaboliques et biomarqueurs du stress oxydatif.

1. Effet de lambda-cyhalothrine et le deltaméthrine et le *Punica granatum*L. sur le gain de poids et l'évolution du poids corporel relatif chez les souris :

Les résultats obtenus d'après notre étude de l'effet du traitement par la LCT et la DM sur le poids corporels des souris montrent qu'il y a une diminution significative de la croissance corporelle des différents groupes, due peut être à la réduction de la consommation alimentaire au cours de l'expérimentation. Cette diminution traduite, ainsi que par d'autres médiateurs chimiques tels que certains cytokines pro-inflammatoires que l'organisme puisse libérer après les effets toxiques des pesticides (Carole et Harve, 2011 ; Viviana, 2015). Ces résultats sont en accord avec les travaux de Rezzag et Serouti (2015), qui ont signalé une réduction dans la consommation de la nourriture chez les souris survenue à une toxicité subchronique. Par ailleurs, l'utilisation de la *Punica granatum* a montré une amélioration de ces paramètres pondéraux des animaux. Ceci pourrait être la conséquence de son pouvoir antioxydant en normalisant l'homéostasie redox intracellulaire et le rétablissement de l'état psychique des animaux. (Cliona et al., 2011 ; Toumi et al., 2013).

Nos résultats de l'évaluation du PRP montrent une augmentation significative du poids relatif des poumons chez les groupes traités par la DM, LCT et DM+LCT et EXT+LCT peut être due à la diminution du poids corporel des animaux traités par ces pesticides.

2. Effet de lambda-cyhalothrine et le deltaméthrine et le *Punica granatum* sur les paramètres métaboliques chez les souris :

Nos résultats montrent une diminution très hautement significative dans les paramètres métaboliques chez les souris traitées par les deux pesticides DM et LCT et l'extrait, par rapport le témoin. Le taux de protéine diminué est expliqué l'occurrence par une dénaturation

protéique et aussi par la diminution de la synthèse des protéines due à l'atteinte au système transcription-traduction au niveau cellulaire. Une autre explication serait l'utilisation excessive des molécules protéiques impliquées dans la défense anti-oxydante contre les ROS libérées suite à la consommation des différents xénobiotiques.

La diminution de la contenance en lipides indique une dégradation par oxydation et qui peut être mis en évidence par le dosage du MDA. Et la diminution des glucides se référer à consommation très élevée des molécules énergétique nécessaire pour mener une défense contre les attaques des radicaux libres issus de l'intoxication. (Najib Z, et al., 2010).

3. Effet de lambda-cyhalothrine et le deltaméthrine sur la teneur de malondialdéhyde (MDA) chez les souris :

Le malonediaaldéhyde (MDA) est un produit final de la peroxydation lipidique résultant de l'interaction entre les ROS et les membranes cellulaires et subcellulaires (Aslan et al., 1997)

Dans notre étude nous enregistrons une augmentation très hautement significative du marqueur de la peroxydation lipidique le MDA, dans les poumons chez le lot exposé a la deltaméthrine, par rapport aux témoins, ce qui indique une diminution des antioxydants qui jouent un rôle très importants dans l'inhibition de la peroxydation lipidique (Vertuani et al., 2004),

L'activité de MDA chez les souris traités par la Lambda-cyhalothrine montre une diminution significative par rapport les souris témoins, cela explique qu'il n'ya pas une peroxydation lipidique. (Mohamed M et al., 2010).

4. Effet de la lambda-cyhalothrine et deltaméthrine sur l'activité du glutathion peroxydase GPx :

GPx c'est une enzyme dépendante de sélénium, elle décompose le peroxyde d'hydrogène en eau et oxygène moléculaire par l'oxydation du glutathion réduit (Ewis and Abdel-Rahman., 1995) au cour d'étude expérimentale, nous avons constaté une diminution significative de l'activité enzymatique de la glutathion peroxydase (GPx) dans les poumons chez les souris traités par LCT , cette baisse d'activité pourrait être directement expliquée par la faible concentration du glutathion réduit (GSH); car ce dernier est un substrat et cofacteur de GPx (Hussain et al., 2005).

La déplétion de la défense antioxydante des poumons a été associée par une peroxydation lipidique importante, révélée par l'augmentation progressive du taux de malondialdéhyde chez les souris traités par ce dernier. Ce résultat est confirmé par les travaux de (Fridowich

et **Freeman ; 1986. Frank ; 1983**) dans la théorie des radicaux libres qui suggère que la diminution de ces enzymes (enzymes à effet antioxydant) diminue la capacité antioxydante du poumon et intensifie la peroxydation des lipides dans les membranes cellulaires.

5. Effet des de lambda-cyhalothrine et le deltaméthrine sur la teneur de Catalase (CAT) :

La catalase (CAT) est une hémoprotéine qui catalyse la réduction des peroxydes d'hydrogène en H₂O et en oxygène et protège les tissus des radicaux hydroxyles qui sont très réactifs (**Sathishsekar et Subramanian., 2005**). Nous avons enregistré une diminution très hautement significative de l'activité du catalase au niveau des reins des souris traités par DM. Ces résultats s'accordent aux travaux **Manonmani et ces collaborateurs (2005)**, cette réduction peut être due à la production excessive d'H₂O₂, Ils l'ont expliquée comme étant le résultat de la glycation non enzymatique (**Rajasekaran et al., 2005**).

L'activité de catalase (CAT) dans les lots traités par la LCT une augmentation très hautement significative par rapport le lot de témoin cela explique la diminution d'une consommation ROS. Les résultats obtenus par (**Fetoui H et al., 2011**) montre également l'augmentation au niveau d'activité de CAT dans le traitement au LCT chez les *rats wistar*, les groupes peuvent impliquer la décomposition de H₂O₂ et peut représenter un aspect de la réponse cellulaire, augmentation des niveaux de ROS induits par la toxicité des LCT.

6. Effet de *Punica granatum* sur les paramètres de stress oxydatif :

La grenade présente une bonne capacité antioxydante et est un piège efficace pour plusieurs espèces réactifs de l'oxygène, principalement en raison de sa teneur élevée en acides phénoliques, flavonoïdes et autres composés polyphénoliques (**Aviram et al., 2000**).

Notre résultat montre que dans la majorité des paramètres étudiés, les lots traités par l'extrait de grenade présente un changement pas significatif par rapport au témoin. Ces résultats montrent que les extraits d'écorces de grenade peuvent Prévenir la production de radicaux libres et les neutraliser.

Conclusion générale

Conclusion

Les pesticides sont des composés chimiques dotés de propriétés toxicologiques, utilisés par les agriculteurs pour lutter contre les animaux ou les plantes jugés nuisibles aux plantations.

Ce travail nous a permis de mettre en évidence l'effet des pesticides (Deltaméthrine et Lambda-cyhalothrine) sur l'évolution du poids corporel, ainsi que le bilan métabolique et enzymatique chez les souris *Mus musculus*L.

Dans notre étude, nous nous sommes concentrés sur les effets sur les poumons induits par le deltaméthrine et de lambda-cyhalothrine chez les souris par administration orale.

Nos résultats indiquent que ces deux pesticides qui appartiennent consécutivement à la famille de pyréthrinoïdes peuvent causer de multiples troubles pulmonaires. Par conséquent, l'utilisation de la *Punica granatum* qui est le flavonoïde a abouti à des résultats positifs sur l'organisme grâce à sa capacité à piéger les radicaux libres responsable du stress oxydatif qui cause de multiples dégâts au niveau cellulaire et par conséquent sur tout l'organisme.

Pour atteindre notre objectif nous sommes procédé à une série d'analyse de paramètres de croissance (poids relatif et gain de poids), enzymatiques (GPx et CAT), biomarqueurs de peroxydation lipidique (MDA), et sur les métabolites (protéines, glucide et lipide) sur des souris pendant 15 jours de traitement par gavage avec des doses de 3,8 ml/kg/j pour la lambda-cyhalothrine, 50 ml/kg/j pour le deltaméthrine et 50 ml/kg/j pour le *Punica granatum*L.

A la lumière des résultats obtenus on a constaté une diminution significative des indicateurs de croissance tels que le poids corporel et du paramètres métaboliques (protéines, glucide et lipide) et l'activité de catalase (CAT), avec une augmentation de l'activité enzymatique de GPx et de MDA qui est un biomarqueur de peroxydation lipidique.

En perspectives :

Il serait intéressant d'approfondir ces conclusions par :

- ✓ L'étude d'autres paramètres de la toxicité des pesticides « GSH, GSTs, SOD...).
- ✓ L'analyse phytochimique de l'extrait des écorces du grenadier afin de déterminer les molécules responsables de son pouvoir anti-oxydant.

Références bibliographiques

A

- _Abbasi H., Rezaei K. et Rashid L. (2008). Extraction of Essential Oils From the Seeds of Pomegranate Using Organic Solvents and Supercritical CO₂. *J Am Oil Chem Soc*, 85: 83–89.
- _Ackland, M.L., van de Waarsenburg, S., Jones, R., 2005. Synergistic antiproliferative action of the avonols quercetin and kaempferol in cultured human cancer cell lines. *In Vivo*. 19, 69–76.
- _Adams, L.S., Seeram, N.P., Aggarwal, B.B., Takada, Y., Sand, D., Hber, D., (2006). Pomegranate juice, total pomegranate ellagitannins and punicala- gin suppress in ammatory cell signaling in colon cancer cells. *J. Agric. Food Chem.* 54, 980–985
- _AL-BANDAK G., OREOPOULOU V. (2007).-Antioxidant properties and composition of Majorana syriaca extracts. *European Journal of Lipid science and technology*, 109 (3): 247-255
- _Aldridge WN. 1990. An assessment of the toxicological properties of Pyrethroids and their toxicity; *CRC Rev. Toxicol* 21 89-104
- _Alzoubi K- H., Khabour O- F., Abu Rashid B., Damaj I- M. et Salah H-A. (2012). The neuroprotective effect of vitamin E on chronic sleep deprivation-induced memory impairment: The role oxidative stress. *Behavioural Brain Research*. 226: 205- 210.of
- _Anadon, A., Martinez, M., Martinez, M. A., Diaz, M. J. et Martinez-Larranaga, M. R. (2006). Toxicokinetics of lambda-cyhalothrin in rats. *Toxicol Lett*, 165(1), 47-56. doi: 10.1016/j.toxlet.2006.01.014
- Andres A., Donovanb S-M. et Kuhlenschmidtc M-S. (2009). Soy isoflavones and virus infections. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 20: 563–569.
- _Ansari, R. W., Shukla, R. K., Yadav, R. S., Seth, K., Pant, A. B., Singh, D., Khanna, V. K. (2012). Involvement of dopaminergic and serotonergic systems in the neurobehavioral toxicity of lambda-cyhalothrin in developing rats. *Toxicol Lett*, 211(1), 1-9. doi: 10.1016/j.toxlet.2012.02.012
- Aviram M., Dornfeld L., Rosenblat M., Volkova N., Kaplan M., Coleman R., FuhrmanB., (2000). Pomegranate juice consumption reduces oxidative stress, atherogenic modifications to LDL, and platelet aggregation : studies in humans and in atherosclerotic apolipoprotein E–deficient mice. *The American journal of clinical nutrition*, vol 71, no 5, p. 1062-1076.
- _Aviram, M., Dornfeld, L., Kaplan, M., Coleman, R., Gaitini, D., Nitecki, S., Hofman, A., Rosenblat, M., Volkova, N., Presser, D., Attias, J., Hayek, T., Fuhrman, B., (2002). Pomegranate juice flavonoids inhibit low-density lipoprotein oxidation and cardiovascular

disease: studies in atherosclerotic mice and in humans. *Drugs under Exp. Clin. Res.* 28, 49–62.

_Azadzoï, K.M., Schulman, R.N., Aviram, M., Siroky, M.B., 2005. Oxidative stress in arteriogenic erectile dysfunction: prophylactic role of antioxidants. *J. Urol.* 174(1), 386-93

_Aouey, B., Derbali, M., Chtourou, Y., Bouchard, M., Khabir, A. et Fetoui, H. (2017). Pyrethroid insecticide lambda-cyhalothrin and its metabolites induce liver injury through the activation of oxidative stress and proinflammatory gene expression in rats following acute and subchronic exposure. *Environ Sci Pollut Res Int.* doi: 10.1007/s11356-016-8323-4

B

_Balasundram N., Sundram K. et Samman S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry.* 99: 191–203.

_BRUNETON, J. (1993). Huiles essentielles, dans *Pharmacologie: phytochimie, plantes médicinales*, 2è éd. ,Éd. Lavoisier, Paris, 406-466

_Bruneton, J. (1999). *Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales*, (3è éd.). Editions Tec & Doc Lavoisier, p 1120

_BESOMBES C. 2008.-Contribution à l'étude des phénomènes d'extraction hydro-thermo-mécanique d'herbes aromatiques. Applications généralisées. Thèse doctorat en Génie des Procédés Industriels. Université de la rochelle Orléans. 289p

_BUDIC-LETOC I., LOVRIC T., PEZO I., KLUJUZURIC J.G. 2005.-Study of dynamics of polyphenol extraction during traditional and advanced maceration processes of the babic grape variety. *Food Technology and Biotechnology*, 43(1): 47-53.

_Basli, A., Chibane, M., Madani, K., and Oukil, N. (2012). "Activité antibactérienne des polyphénols extraits d'une plante médicinale de la flore d'Algérie: *Origanum glandulosum* Desf." *Phytothérapie*, 10(1), 2-9.

_Bors, W., Michel, C., and Stettmaier, K. (1997). "Antioxidant effects of flavonoids." *Biofactors*, 6(4), 399-402

_Benoit Bock. 2013. *Tela Botanica : Base de données Nomenclature de la flore en France.* BDNFF, 4p.

_Bast A. et Haenen G-R-M-M. (2002). The toxicity of antioxidants and their metabolites. *Environmental Toxicology and Pharmacology.* 11: 251-258.

_Bazzi LH. (2010). Etude de la persistance de quelques pesticides dans la culture de l'haricot vert dans la région de Souss Massa. Thèse de doctorat en science, spécialité Environnement. Université Ibn Zohr : Ecole nationale des sciences appliquées Agadir. 139p.

_Bouvier,G.,(2005).contribution à l'évaluation de l'exposition de la population francilienne aux pesticides .université rené descartes-parisv.

_Bao G,Wang MH, William LC, Dao JC, Zheng JS. 2007. Risk assessment of cyhalothrin on aquatic organisms in paddy field in China. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, **48**: 69-74.

_Bradberry, S. M., Cage, S. A., Proudfoot, A. T. et Vale, J. A. (2005). Poisoning due to pyrethroids. *Toxicol Rev*, *24*(2), 93-106

C

_Crozier, A., Clifford, M.N., Ashihara, H. (2006). Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet. Edt Blackwell Publishing Ltd.

_Cowan, M. M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews*, *12*(4), 564-582.

_Calin Sanchez Angel et Carboneli Banaching Angel A.2005. La grenade cultivées en Espagne Punicalogine anti-oxydante du jus de grenade et de l'extrait de grenade dans les l'aliment fonctionnelle du fruit. Livre. Natural ontioxydant granatum+ et université Miguel Hernandez (EDS), Murcia Espagne, 77p

-Carole I., et Harvé Q., 2011. Désordres métaboliques et réanimation : de la physiopathologie au traitement. Berlin Heidelberg. New York. ISBN. 978-2-287-99026-7. pp 522.

_Cotonat J. (1996). La toxicologie. Presses universitaires de France, Paris. 127p.

_Couteux A., Salaün C. (2009). Index phytosanitaire ACTA 2009. 45ème édition. Association de Coordination Technique Agricole. MAME.

_CPP. (2002). Risques sanitaires liés à l'utilisation des produits phytosanitaires. *Comité de la Prévention et de la Protection*. 47p

D

_Deaton C-M. et Marlin D-J. (2003). Exercise-Associated Oxidative Stress. *Clinical Techniques in Equine Practice*. Vol 2. 3: 278-291

_DEGUINE J.-P., FERRON P., RUSSELL D., 2008- Protection des cultures: de l'agrochimie à l'agroécologie. Ed. Editions Quae, Paris. 187p.

E

_ESCRIBANO-BAILON, SANTOS-BUELGA. (2003).-Polyphenols extraction from foods. In *Methods in polyphenol analysis*. Royal Society of Chemistry. Thomas Graham House, Science.

_EFSA SCIENTIFIC REPORT, 2006- Conclusion regarding the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance metribuzin. EFSA Scientific Report. Vol. (88): 1-74.

_EuroCom (European Commission) (2002) Review report for the active substance Deltamethrine: ECHealth and consumer protection directorate general-E1 Plant health. p53

F

_FLORENT D. 2011.- Caractérisation de nouvelles molécules et variabilité chimique de trois plantes du continuum Corsésar daigne: *Chamaemelum mixtum*, *Anthemis maritima* et *Eryngium maritimum*. Thèse de doctorat en Chimie. Université de corse-pascal paoli. 234 p

_Fliegmann J., Furtwängler K., Malterer G., Cantarello C., Schüler G., Ebel J. et Mithöfer A. (2010). Flavone synthase II (CYP93B16) from soybean (*Glycine max* L.). *Phytochemistry*. 71: 508–514.

_Fu L., Xu B-T., Xu X-R., Gan R-Y., Zhang Y., Xia E-Q. et Li H-B. (2011). Antioxidant capacities and total phenolic contents of 62 fruits. *Food Chemistry*. 129: 345–350.

_Fardet A., Rock E. et Rémésy C. (2008). Is the in vitro antioxidant potential of whole-grain cereals and cereal products well reflected in vivo. *Journal of Cereal Science*. 48: 258-276.

_Falleh H., Ksouri R., Medini F., Guyot S., Abdelly C. et Magné C. (2011). Antioxidant activity and phenolic composition of the medicinal and edible halophyte *Mesembryanthemum edule* L. *Industrial Crops and Products*. 34: 1066–1071.

_FAO/WHO Commission du Codex Alimentarius. (1998). Résidus des pesticides dans les denrées alimentaires. Roma.

-Favier. A. Le stress oxydant : Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique, l'actualité chimique, *Mécanismes biochimiques*.(2003).108-115.

_FORTIER J., MESSIER C., et COLL L., (2005)- La Problématique de l'utilisation des herbicides en foresterie: le cas du Québec. *La revue en sciences de l'environnement*. Vol. (6): 1-19.

_FAO., 1994- Codex Alimentarius: Résidus de pesticides dans les denrées alimentaires. Volume 2. Ed. Food & Agriculture Org, Rome. 778p.

_Fréry N., Saoudi A., Garnier R., Zeghnoun A., Flac G., Guldner L., (2011). Exposition de la population française aux substances chimiques de l'environnement. Tome 1-présentation générale de l'étude- Métaux et métalloïdes. Institut de veille sanitaire.

_Fetoui, H., Garoui el, M. et Zeghal, N. (2009). Lambda-cyhalothrin-induced biochemical and histopathological changes in the liver of rats: ameliorative effect of ascorbic acid. *Exp Toxicol Pathol*, 61(3), 189-196. doi: 10.1016/j.etp.2008.08.002

G

_Gross, G. G. (1992). Enzymes in the biosynthesis of hydrolyzable tannins. In *Plant polyphenols* (pp. 43-60). Springer US.

_Ghasemnezhad M., Sherafati M. et Payvast G-A.(2011). Variation in phenolic compounds, ascorbic acid and antioxidant activity of five coloured bell pepper (*Capsicum annum*) fruits at two different harvest times. *Journal of functional foods*. 3: 44 –49.

_Guignard J .L. (1979). Abrégé de biochimie végétale. 2e édition.Masson. P173-231. Heim K-E., Tagliaferro A- R. et Bobilya D-J. (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 13: 572–584.

_Genoux, E. (2011). Dérivés de flavonoïdes et de vérapamil comme ligands des transporteurs MRP1 et ABCG2: de la conception à l'activité anticancéreuse, Université de Grenoble.

_Gerber, M., Boutron-Ruault, M.-C., Hercberg, S., Riboli, E., Scalbert, A., and Siess, M.- H. (2002). "Actualités en cancérologie: fruits, légumes et cancers. Une synthèse du réseau Nacre." *Bulletin du cancer*, 89(3), 293-312.

_GODET J.D. - Arbres et arbustes aux quatre saisons. Les guides pratiques du naturaliste. Editions Delachaux et Niestlé. 1991. 215 pages. Pages 96 et 170

_Gaté L., Paul J., Nguyen Bal G., Tew K-D. et Tapiérol H. (1999). Oxidative stress induced in pathologies: the role of antioxidants. *Biomed & Pharmacother*. 53: 169- 80.

_Gouttebel M-C., Zhang G-H., Saingra B. et Joyeux H. (1996). Role protecteur d'un apport oral de sélénium et de vitamine E vis-à-vis de la cardiotoxicité induite par les anthracyclines chez le rat. *Nutr. Clin. Métabol*. 10 : 69-76

H

_Herbert, R.B. 1989. The Biosynthesis of secondary metabolites. 2^{ème} édition Chapman and Halle p 2, 11-115.

_Hurtado-Fernandez E., Gomez-Romero M., Carrasco-Pancorbo A. et Fernandez-Gutierrez A. (2010). Application and potential of capillary electroseparation methods to determine antioxidant phenolic compounds from plant food material. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 53: 1130–1160.

- _Harrar, A.E.N., (2012).** Activités antioxydante et antimicrobienne d'extraits de *Rhamnus alaternus* L. Thèse de Magister Biochimie et physiologie expérimentale, Université Ferhat Abbas, Sétif. Algérie. 73 p.
- _Haslam, E. (1998).** Practical polyphenolics: from structure to molecular recognition and physiological action. Cambridge University Press
- _Heo H-J., Kim Y-J., Chung D. et Kim D-O. (2006).** Antioxidant capacities of individual and combined phenolics in a model system. *Food Chemistry*. 104: 87–92.
- Hayouni E-A., Abedrabba M., Bouix M. et Hamdi M. (2007).** The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities in vitro of Tunisian *Quercus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. fruit extracts. *Food Chemistry*. 105: 1126–1134.
- _HSDB (2001)** Deltamethrin. Hamilton : Centre canadien d'Hygiène et de Sécurité. Consultable sur le site www.toxnet.nlm.nih.gov/. Last revision date 2001-10-10
- _He F, Wang S, Liu L, Chen S, Zhang Z, Sun J (1989)** Clinical manifestations and diagnosis of acute pyrethroid poisoning. *Arch Toxicol* 63: 54-58
- _Hossain, M. M., Suzuki, T., Sato, I., Takewaki, T., Suzuki, K. et Kobayashi, H. (2005).** Neuromechanical effects of pyrethroids, allethrin, cyhalothrin and deltamethrin on the cholinergic processes in rat brain. *Life sciences*, 77(7), 795-807.
- Husain R., Malaviya M., Seth PK., Husain R. 1994.** Effect of deltamethrin on regional brain polyamines and behaviour in young rats. *Pharmacol. Toxicol.* 74, 211–215.
- Hossain, M. M., Suzuki, T., Sato, I., Takewaki, T., Suzuki, K. et Kobayashi, H. (2005).** Neuromechanical effects of pyrethroids, allethrin, cyhalothrin and deltamethrin on the cholinergic processes in rat brain. *Life sciences*, 77(7), 795-807.

I

- _INRS (2007)** Deltaméthrine. Institut National de Recherché et de Sécurité pour la prévention des accidents du travail et des maladies professionnelles. établie par les services techniques et médicaux de l'INRS. Paris. Fiche toxicologique 193. 11pp
- _IPCS INCHEM (1990)** Deltamethrin. Environmental health criteria EHC 97. WHO. Consultable sur le site www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc97.htm/
- _INRS (2016)** Deltamethrine. Base de données fiches toxicologiques. 07pp. <http://www.inrs.fr/fichetox>
- _Iyyadurai, R., Peter, J. V., Immanuel, S., Begum, A., Zachariah, A., Jasmine, S. et Abhilash, K. P. P. (2014).** Organophosphate-pyrethroid combination pesticides may be

associated with increased toxicity in human poisoning compared to either pesticide alone. *Clinical Toxicology*, 52(5), 538-541. doi: 10.3109/15563650.2014.909933

J

_Jeyaramraja P-R., Meenakshi S-N., Kumar R-S., Joshi S-D. et Ramasubramanian B. (2005). Water deficit induced oxidative damage in tea (*Camellia sinensis*) plants. *Journal of Plant Physiology*. 162: 413- 421.

_JESSE UNEKE C., (2007)- Integrated Pest Management for Developing Countries: A Systemic Overview. Ed. Nova Publishers, New York. 203p

-Juliet S., Chakraborty AK., Koley KM., Mandal TK., Bhatta-charyya A. (2001). Toxicokinetics, recovery efficiency and micro-somal changes following administration of deltamethrin to black Bengal goats. *Pest. Manag. Sci.* 57, 311–319.

K

_KAUFMANN B., CHRISTEN P. (2001).-"Parameters affecting microwave-assisted extraction of withanolides." *Phytochemical Analysis*, 12: 327-331.

_KOK M.F., YONG F.M., LIM G. 1987.-Rapid extraction method for reproducible analysis of aroma volatiles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 35: 779-781.

_Kulkarni A. P., Aradhya S. M. et Divakar S. (2004). Isolation and identification of a radical scavenging antioxidant : punicalagin from pith and carpellary membrane of pomegranate fruit. *Food Chemistry*, 87 : 551–557

_Kawaii, S., Lansky, E.P., (2004). Differentiation-promoting activity of pomegranate (*Punica granatum*) fruit extracts in HL-60 human promyelocytic leukaemia cells. *J. Med. Food*. 7 (1), 13 -8.

-Kowalczyk-Bronisz SH., Gieldanowski J., Bubak B., (1990). Immunological profile of animals exposed to pesticide deltamethrin. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)*. 38, 229–238.

L

_Li H., Deng Z., Wu T., Liu R., Loewen S. et Tsao R. (2011). Microwave-assisted extraction of phenolics with maximal antioxidant activities in tomatoes. *Food Chemistry*. 130: 928–936.

_Luthria D-L., Biswas R. et Savithiry N. (2007). Comparison of extraction solvents and techniques used for the assay of isoflavones from soybean. *Food Chemistry*. 105: 325–333

_Lansky E., Shubert S. et Neeman I. (2000). Pharmacological and therapeutic properties of pomegranate. In : Melgarejo-Moreno P. (ed.), Martínez-Nicolás J.J. (ed.), Martínez-Tomé J. (ed.) *Production, processing and marketing of pomegranate in the Mediterranean region:*

Advances in research and technology, Zaragoza : CIHEAM-IAMZ, (2000). 253 p. ISBN 2-85352-214-8.

Lansky, E.P., Harrison, G., Froom, P., Jiang, W.G., (2005). Pomegranate (*Punica granatum*) pure chemicals show possible synergistic inhibition of human PC-3 prostate cancer cell invasion across Matrigel. *Investigational New Drugs*. 23, 121-2.

LEYRAL G., VIERLING E., (2007)- Microbiologie et toxicologie des aliments: Hygiène et sécurité alimentaires. Ed: 4. Wolters Kluwer, France. 287p.

M

Marcheix J-J., Fleuriet A. et Jay-Allemand C-H. (2005). les composés phénoliques des végétaux: presse polytechniques et universitaires de Romandes. 192p.

Maarouf A .2000. Dictionnaire botanique Pp 129.

MICHEL T. 2011.-Nouvelles méthodologies d'extraction, de fractionnement et d'identification :Application aux molécules bioactives de l'argousier (*Hippophae rhamnoides*). Thèse de doctorat en chimie Analytique Phytochimie. Université d'Orléans. 288 p.

MACLEOD J.L., TROCONIS N.G. (1982).- Volatile flavour components of mango fruit. *Phytochemistry*, 21: 2523-2526.

Mestres R., Mestres G. 1992. Deltamethrin: uses and environmental safety. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 124, 1–18.

Mladinka P., Zatloukalova L., Filipisky T. and Hrdina R. *Free Radical Biology & Medicine*; 49.2010.963-975.

Montoro, P., Braca, A., Pizza, C., and De Tommasi, N. (2005). "Structure–antioxidant activity relationships of flavonoids isolated from different plant species." *Food Chemistry*, 92(2), 349-355.

Melgarejo M. P., Martinez V. R., (1992). El granado. Ed. Mundi-Prensa, Madrid.

Mertens-Talcott, S.U., Jilma-Stohlawetz, P., Rios, J., Hingorani, L. and Derendorf, H., 2006. Absorption, metabolism and antioxidant effects of pomegranate (*Punica granatum* L.) polyphenols after ingestion of a standardized extract in healthy human volunteers. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, vol 54, p. 8956-8961.

Morton J. (1987). Pomegranate. In: *Fruits of warm climates*. Miami, Florida. p. 352–355.

Madlener, S., Illmer, C., Horvath, Z., Saiko, P., Losert, A., Herbacek, I., Grusch, M., Elford, H.L., Krupitza, G., Bernhaus, A., Fritzer-Szekeres, M., Szekeres, T., 2006. Gallic acid inhibits ribonucleotide reductase and cyclooxygenases in human HL-60 promyelocytic leukemia cells. *Cancer Letters* (Epub ahead of print).

_Miwa K. et Fujita M. (2008). Increased oxidative stress suggested by low serum vitamin E concentrations in patients with chronic fatigue syndrome. *Food Chemistry*. 238-239.

_Mohamed Dakhli. Effect of Pomegranate (*Punica granatum* L). Juice and Methanolic Peel. Extract on Testis of male Rats. **October (2013)**.

-Manonmani G., Bhavapriya V., Kalpana S., Govindasamy S and Apparamantham T. Antioxidant activity of Cassia fistula (liun) flowers in aloxan induced diabetic rats: *Journal of Ethnopharmacology*.97.2005.39-42.

_Moser, V. C., Liu, Z., Schlosser, C., Spanogle, T. L., Chandrasekaran, A. et McDaniel, K. L. (2016). Locomotor activity and tissue levels following acute administration of lambda- and gamma-cyhalothrin in rats. *Toxicol Appl Pharmacol*, 313, 97-103. doi: 10.1016/j.taap.2016.10.020

_Michelangeli, F., Robson, M., East, J. et Lee, A. (1990). The conformation of pyrethroids bound to lipid bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1028(1), 49-57

N

_NICOLAS V. 2012.-Contribution chimique a la definition de la qualite : exemples des spiritueux de myrte (*Myrtus communis* L.) et de cedrat (*Citrus medica* L.).Thèse de doctorat en chimie. Université de Corse-pascal Paoli. 252 p.

_Neurath, A.R., Strick N., Li Y.Y., Debnath A.K., 2004. Punica granatum (Pomegranate) juice pro-vides an HIV-1 entry inhibitor and candidate topical microbicide. *BMC Infect. Dis.* 4, 41.

_Nair V-D., Panneerselvam R. et Gopi R. (2012). Studies on methanolic extract of Rauwolfia species from Southern Western Ghats of India – *In vitro* antioxidant properties, characterisation of nutrients and phytochemicals. *Industrial Crops and Products*. 39: 17– 25.

-Nijveldt J.R., Nood E.,Hoorn D., Boelens P.G., NorrenK., Leewen P.Flavonoids:a review of probable mechanisms of action and potential applications, *Am J Clin Nutr*, 74.2001.418-25.

O

_Oukabli A. (2004). Le Grenadier : *Des Variétés Performantes pour la Culture*. Bulletin mensuel d'information et de liaison du PNTTA. MADRPM/DERD, 123 : 1-4.

_OMS Organisation mondiale de la santé, (1972) organochlorine pesticides on cellular metabolism of lipids, proteins and carbohydrates : a systematic

_OECD., 1999- Indicateurs environnementaux pour l'agriculture Concepts et cadre d'analyse Volume 1: Concepts et cadre d'analyse. Ed. OECD Publishing, France. 52p

_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, repartition et caractéristiques écologiques. P: 86-88.

P

_Pandey, K. B., & Rizvi, S. I. (2009). Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2(5), 270-278P

_PENCHEV P.I. 2010.-Étude des procédés d'extraction et de purification de produits bioactifs à partir de plantes par couplage de techniques séparatives à basses et hautes pressions. Thèse de docteur. Université de Toulouse. 239 p.

-Perze-Vicente, A., Izquierdo, A. and Garcia-Viguera, C., 2002. *In vitro* gastrointestinal digestion study of pomegranate juice phenolic compounds, anthocyanins and vitamin C. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, vol 50, p.2308-2312.

_Prashanth, D., Asha, M.K., Amit, A., 2001. Antibacterial activity of *Punica granatum*. *Fitoterapia*. N°72. Pages 171-173.

_Powers S-K., Bradley W-N. et Hudson M-B. (2011). Exercise-induced oxidative stress in humans: Cause and consequences. *Free Radical Biology & Medicine*. 51: 942-950.

_Poston L, et Raijmakers M-T-M. (2004). Trophoblast Oxidative Stress, Antioxidants and Pregnancy Outcome. 18: 72-78.

_Parrilla-Taylor D-P. et Zenteno-Savín T. (2011) Antioxidant enzyme activities in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in response to environmental hypoxia and reoxygenation. *Aquaculture*. 318: 379-383.

_Poortmans J- R et Boisseau N. (2003). Stress et exercices. In << Biochimie des activités physiques >>. 2em éd. De Boeck Supérieur. 416-417.

_PMRA., 2013- Proposed Maximum Residue Limit PMRL2013-37 Metribuzin. Ed. The Health Canada Pest Management Regulatory Agency, Ottawa. 4p.

Q

_Quideau, S., D. Deffieux, et al. (2011). "Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis." *Angewandte Chemie International Edition* 50(3): 586-621.

R

_Richter G. (1993). Métabolismes des végétaux <<physiologie et biochimie >>. Edition presse polytechniques et universitaires de Romandes: 317-339.

_Rackova L., Firakova S., Kostalova D. Stefek M. (2005). Oxidation of liposomal membrane suppressed by flavonoids: Quantitative structure–activity relationship. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 13: 6477–6484

-Rajasekaran, S., Sivagnanam, K., Subramanian, S. Antioxidant effect of Aloe vera gel extract in streptozotocin induced diabetic rats. *Pharmacological Reports* .57.2005.90-96.

_Rana T.S., Narzary D., Ranade S.A., 2010. Systematics and taxonomic disposition of the genus Punica L. Pomegranate. Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology, vol 4, p. 19-25.

_Ratnam D-V., Ankola D-D., Bhardwaj V., Sahana D-K. et Ravi-Kumar MN- V. (2006). Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. *Journal of Controlled Release*. 113: 189–207.

_Rocha-Guzman N-E., Herzog A., Gonzalez-Laredo R-F., Ibarra-Perez FJ., Zambrano-Galvan G. et Gallegos-Infante J-A. (2007). Antioxidant and antimutagenic activity of phenolic compounds in three different colour groups of common bean cultivars (*Phaseolus vulgaris*). *Food Chemistry*. 103: 521–527.

_Righi, D. A. et Palermo-Neto, J. (2003). Behavioral effects of type II pyrethroid cyhalothrin in rats. *Toxicology and applied pharmacology*, 191(2), 167-176

S

_SPIGNO G., TRAMELLI L., De FAVERI D. M. 2007.-Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *Journal of Food Engineering*, 81: 200-208

_Škerget, M., Kotnik, P., Hadolin, M., Hraš, A. R., Simonič, M., and Knez, Ž. (2005). "Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities." *Food Chemistry*, 89(2), 191-198.

_Stobiecki, M. and P. Kachlicki (2006). Isolation and Identification of Flavonoids. *The Science of Flavonoids*. E. Grotewold. Columbus: 24.

_Stover E. et Mercure E. W. (2007). The Pomegranate : A New Look at the Fruit of Paradise *HortScience*, 42(5) : 1088-1092.

_Sarkhosh, A., Zamani. Z., Fatahi, R., Ebadi, A., 2006. RAPD markers reveal polymorphism among some Iranian pomegranate (*Punica granatum L.*) Genotypes. *Sci. Hortic*. 111(1), 24-29

_Seeram, N.P., Adams, L.S., Henning, S.M., Niu, Y., Zhang, Y., Nair, M.G., Heber, D., 2005. In vitro antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of punicalagin, ellagic acid

and a total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polyphenols as found in pomegranate juice. *J. Nutr. Biochem.* 16, 360–367.

_Sun L., Zhang J., Lu X., Zhang L. et Zhang Y. (2011). Evaluation to the antioxidant activity of total flavonoids extract from persimmon (*Diospyros kaki L.*) leaves. *Food and Chemical Toxicology.* 49 : 2689–2696

_SIBIEUDE C., SIBIEUDE T., THIVANT J., 1993- Les rouages économiques de l'environnement : 64 dossiers-clés, 58 cas concrets, 68 schémas, 397 définitions. Ed. Editions de l'Atelier, Paris. 346p

_Shivanoor SM, David M (2014) Protective role of turmeric against deltamethrin induced renal oxidative damage in rats. *Biomedicine & Preventive Nutrition* 4: 543-553

_Scassellati SG, Moretti M, Villarini M, Angeli G, Pasquini R, Monarca S, Scarselli R, Crea MG and Leonardis C (1994) An evaluation of toxic and genotoxic risk from work-related exposure to chemical compounds. *Prevenzione Oggi* 6: 125-138

T

_Teixeira da Silva J.A., Rana T.S., Narzary D., Verma N., Meshram D.T., Ranade S. A., 2013, Pomegranate biology and biotechnology: a review. *Scientia Horticulturae*, vol 160, p. 85–107

_Turk, G., Sonmez, M., Aydin, M., Yuce, A., Gur, S., Yuksel, M., Hicazi-Aksu E., Aksoy, H., 2008. Effects of pomegranate juice consumption on sperm quality. Spermatogenic cell density. antioxidant activity and testosterone level in male rats. *Clin. Nutr.* 27, 289-296.

_Therriault M., Caillet S., Kermasha S. et Lacroix M. (2006). Antioxidant, antiradical and antimutagenic activities of phenolic compounds present in maple products. *Food Chemistry.* 98: 490–50

_Thomas R-H., Bernards M-A., Drake E-E. et Guglielmo C-G. (2010). Changes in the antioxidant activities of seven herb- and spice-based marinating sauces after cooking. *Journal of Food Composition and Analysis.* 23: 244–252.

_Tamimi R-M., Lagion P., Adami H-O. et Trichopoulos D. (2002). Prospects of chemoprevention of cancer. *Journal of International Medicine.* 215: 286-300.

_Toumi H. 2013. Ecotoxicité de la deltaméthrine et du malathion sur différentes souches de *Daphnia magna*. These doctrtat. 208p.

U

_Utip B, Young B, Ibiang E, Victor I, Bassey E, Francis A (2013) Effect of Deltamethrin and Ridomil on Sperm Parameters and Reproductive Hormones of Male Rats. *Toxicol Environ Health* 9-14

_US EPA (1998) Deltamethrin; pesticide tolerance. Environmental Protection Agency 53pp

V

_Valls J., Millán S., Martí M-P., Borràs E. et Arola L. (2009). Advanced separation methods of food anthocyanins, isoflavones and flavanols. *Journal of Chromatography A*. 1216: 7143–7172

-Van Acker S.A.B.E., van den Berg D.J., Tromp M.N.J.L., Griffioen D.H., van Bennekom W.P., van der Vijgh W.J.F., Bast A. Structural aspect of antioxidant activity of flavonoids. *Free Rad. Biol. Med.* 20.1996.331-342

_Von Flora Deutschland, O.W.T., Schweiz, O.U.D., 1885. Permission granted to use under GFDL by Kurt Stueber Gera. Germany

_Vannucchi C-I., Jordao A-A. et Vannucchi H. (2007). Antioxidant compounds and oxidative stress in female dogs during pregnancy. *Research in Veterinary Science*. 83: 188-193.

_Vijverberg H. P. M. et van den Bercken J., 1990. Neurotoxicological effects and the mode of action of pyrethroid insecticides; *CRC Rev. Toxicol.* 21 105-126

_Velmurugan B, Selvanayagam M, Cengiz EI, Unlu E. 2007. Histopathology of lambda-cyhalothrin on tissues (gill, kidney, liver and intestine) of *Cirrhinus mrigala*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 24: 286-291

-Viviana VL., Angélica TB., Lina GM., Alejandro M., Marisol RL., 2015. «Acute restraint stress and corticosteronetransiently disrupts novelty preference in an object recognition task». *Behav Brain Res.* 291: 60-66.

W

_Wolansky, M., Gennings, C. et Crofton, K. (2006). Relative potencies for acute effects of pyrethroids on motor function in rats. *Toxicological Sciences*, 89(1), 271-277.

_Weiner, M. L., Nemeč, M., Sheets, L., Sargent, D. et Breckenridge, C. (2009). Comparative functional observational battery study of twelve commercial pyrethroid insecticides in male rats following acute oral exposure. *Neur*

Annexe

❖ Protocole de préparation des solutions :

1. Pour le dosage des protéines :

➤ BSA (1 mg/ml)

Dissoudre 05 mg de BSA dans 05 ml d'eau distillée.

➤ Réactif de Bradford « BBC »

Dissoudre 100 mg de BBC dans 50 ml éthanol (95%) puis agiter pendant 02 Heures. Ajouter 100 ml d'acide ortho phosphorique (85%) Ajouter 850 ml d'eau distillée (pour obtenir 01 l de solution) Conservation à 04 °C.

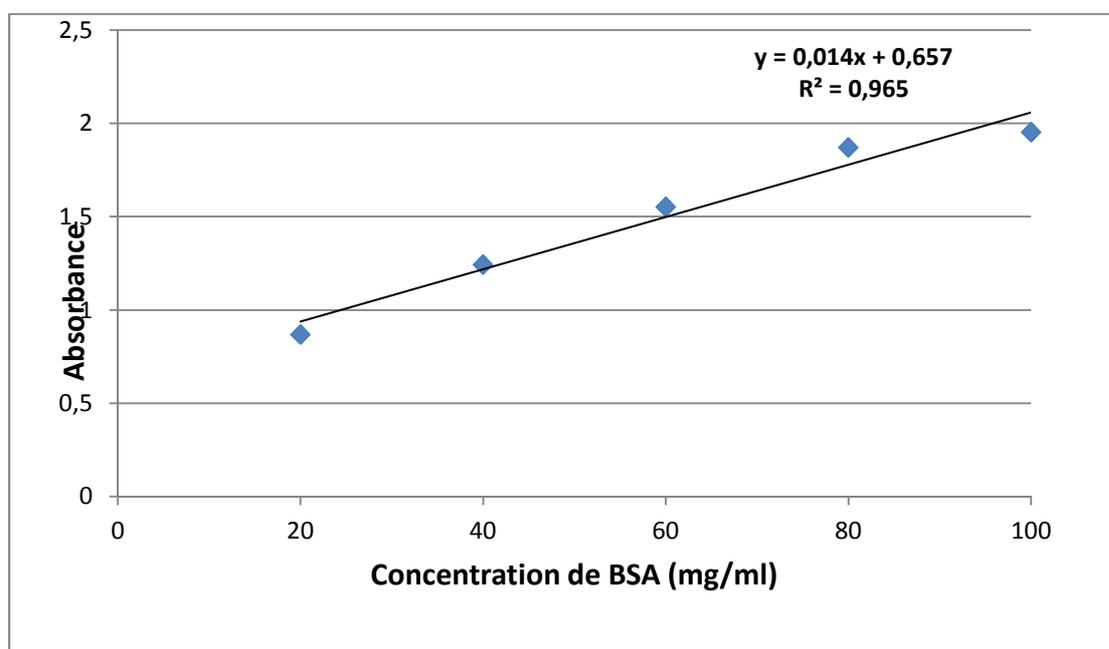


Figure. Droite de régression expérimentant les absorbances à 595 nm en fonction de concentration BSA (mg/l) (R^2 : coefficient de détermination).

2. Pour le dosage MDA :

➤ TBS, Tris, NaCl, PH : 7.4 :

0.878 g de NaCl dans 100 ml d'eau distillée, puis 0.605 g Tris et compléter le volume par la solution NaCl et ajuster le PH à 7.4

➤ TCA- BHT :

20 g TCA dans 100 ml d'eau distillée pour obtenir TCA 20 % puis peser 01 g de BHT et compléter le volume à 100 ml par la solution TCA 20% et agiter à chaud.

➤ Hcl (0,6 M) :

Prélever 5.156 ml d'Hcl et compléter le volume à 100 ml par l'eau distillée.

➤ Tris – TBA :

0,32 g Tris dans 100 ml eau distillée 1,73 g de TBA Compléter le volume à 01 l par la solution Tris (26 mM).

3. Pour le dosage GPx :

➤ GSH (0,1 mM) :

Prendre 3.76 mg de GSH dans 100 ml eau distillée

➤ TCA (01 %) :

Dissoudre 01 g de TCA dans 100 ml d'eau distillée

➤ DTNB (1,0 mM) :

Dissoudre 20 mg de DTNB dans 50 ml de méthanol absolu

4. Pour le dosage CAT :

➤ TP (PH 7.4) :

Solution A : Prendre 3.12 g de NaH_2PO_4 dans 100 ml eau distillée

Solution B : Prendre 7.16 g de NaH_2PO_4 dans 100 ml eau distillée

Mélanger 16 ml de solution A avec 48 ml de solution B

➤ H_2O_2 (1.3 %) :

Dissoudre 1.3 ml de H_2O_2 dans 98.7 ml d'eau distillée

❖ **Matériels et appareils utilisée :**

-H ₂ O ₂ (peroxyde d'hydrogène)	-Centrifugeuse (SELECTA).
-NaCl (Acide chlorhydrique)	-Balance de précision (KERN).
-GSH (Glutathion réduit)	-Etuve (HERAEUS).
-TP (tampon phosphate)	-Agitateur magnétique (WITEG)
-TBA(Acidthiobarbiturique)	-Matériel de dissection.
- BHT (Butyl hydroxy toluene)	-Centrifugeuse sigma 1-15.
-BSA (Albumine sérum de boeuf).	-Réfrigérateur.
-Glucose.	-Bain marie (MEMMERT).
-NaH ₂ PO ₄ (Sodium phosphate monobasique)	-Agitateur Vortex (THERMOS).
-Tris.	-Spectrophotomètre(UVmini1240,
-HC1.	SHIMADZU). -Pissette.
-Méthanol absolu.	-Verre de montre.

<ul style="list-style-type: none"> -Na_2HPO_4 (hydrogénophosphate) -DTNB(1'acide5-5' -dithio-bis-2 nitrobénoïque). -Eau distillée. -TCA (Trichloroacétique). -Anthrone. -Acide sulfurique. -Acide orthophosphorique (à 85%). -Vanilline. -BBC (Bleu Brillant de Coomassie). -Ether. -Chloroforme. -Ethanol (à 80%). 	<ul style="list-style-type: none"> -Spatule. -Baromagnétique. -Micropipettes (10μl à 5000μl). -Pipettes graduées. -Portoirs. -Tubes à essai. -Tubes secs en verre et en plastique. -Tubes eppendorf pour les centrifugeuses sigma. -Cuves pour la spectrophotométrie(en plastique et en quartz). -Papier d'aluminium. -Becher -Entonnoirs. -Eprouvettes graduées
--	---

❖ **Matériels de dissection et de décapitation :**

<ul style="list-style-type: none"> -Ciseaux - Epingles - Papier absorbant - Pincés - Aiguille droite - Boites 	<ul style="list-style-type: none"> - gants - Planche de dissection - Lames de rechange pour Scalpel - Papier aluminium - Scalpel -Balance de précision
---	--