



République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
Université de Larbi Tébessi –Tébessa-  
Faculté des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département des Etres Vivants



**Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de Master**

**Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie**

**Filière : Sciences Biologiques**

**Option : Biotechnologie Végétale**

**Thème :**

**Nephrotoxicité de deux produits phytosanitaires  
chez les souris et effet correcteur de l'extrait  
hydro-méthanolique d'une plante comestible  
*Punica granatum L.***

Présenté Par :

***GACEM Rania***

***FERDI Amina***

***Devant le jury :***

<b>M. SOLTANI Nedjmeddine</b>	M.A.A	Univ. Tébessa	Président
<b>M. MENACEUR Fouad</b>	M.C.A	Univ. Tébessa	Promoteur
<b>M. GASMI Salim</b>	M.A.B	Univ. Tébessa	Examineur

Date de soutenance : 25/06/2019

Année universitaire : 2018/2019

## Résumé

---

Ce travail a pour but d'étudier l'effet protecteur de l'extrait hydro-méthanolique de grenade contre la néphro-toxicité causée par deux pesticides la lambda-cyhalothrine (LCT) et la deltaméthrine (DM).

L'expérience a été menée sur 32 souris (femelles et mâles) pesant entre 25 à 45 g et âgées de 2 à 3 semaines, réparties en huit lots chaque lot contient quatre souris, Le premier lot témoin a reçu l'eau distillée seulement, les autres lots ont été traités avec une dose de 1,38 mg/kg de l'extrait hydro-méthanolique de l'écorce de grenade, seuls ou en mélange avec les pesticides, aux doses estimées à 8,96 mg/kg de deltaméthrine, et à 1,5 mg/kg pour lambda-cyhalothrine par voie oral pendant 15 jours.

Les paramètres de croissance des souris « gain du poids et poids relatifs des reins » ont été évalués ; après sacrifice, les taux des métabolites : lipides, protéines et glucides ont été déterminé au niveau des reins et paramètres du stress oxydatif comprenant les paramètres enzymatiques : Glutathion Peroxydase (GPx) et Catalase (CAT) et non-enzymatiques Malondialdéhyde (MDA) ont été évalués.

Les résultats ont montrés une perte de poids de (8 à 10g) chez les souris traitées avec l'extrait hydro-méthanolique de l'écorce de grenade ainsi que celles exposés aux pesticides. Chez les souris traitées par DM et LCT, le poids des reins a augmenté significativement de (0,4%) par rapport au lot témoin. Des changements dans les paramètres biochimiques et enzymatiques ont pu être observés avec une augmentation de (0,31 mg/ml) de taux de protéines dans les lots traités par les deux pesticides et leur mixture en plus d'une diminution de (30 mg/ml) de la teneur en lipides et de (2,9 mg/ml) de glucides.

Aussi une augmentation significative de (0,4 µg/min/mg de protéine) de l'activité enzymatique de GPx, et de (105 µM/min/mg de protéine) de CAT et de (0,25 µM/min/mg de protéine) de la teneur de MDA indiquant ainsi une peroxydation lipidique importante.

Le traitement avec l'extrait hydro-méthanolique de grenade à une dose de 1,38 mg/kg, nous avons observé une amélioration dans la majorité des paramètres étudiés, ce qui signifie que cet extrait réduit les dommages causés par lambda-cyhalothrine et deltaméthrine

**Les mots clés :** Stress oxydant, lambda-cyhalothrine, deltaméthrine, rein, *Mus musculus*.

## Abstract

---

The purpose of this work is to study the protective effect of pomegranate hydro-methanolic extract against nephrotoxicity caused by two pesticides lambda-cyhalothrin (LCT) and deltamethrin (DM).

The experiment was conducted on 32 mice (females and males) weighing between 25 and 45 g and aged 2 to 3 weeks, divided into eight lots each containing four mice. The first control lot received distilled water only, the other batches were treated with 1.38 mg/kg of hydro-methanolic pomegranate bark extract, alone or in combination with pesticides, at doses estimated at 8.96 mg/kg deltamethrin, and 1.5 mg/kg for lambda-cyhalothrin orally for 15 days.

The growth parameters of mice "relative weight gain and kidney weight" were evaluated; after sacrifice, the levels of metabolites: lipids, proteins and carbohydrates were determined at kidney level and oxidative stress parameters including enzymatic parameters: Glutathione Peroxidase (GPx) and Catalase (CAT) and non-enzymatic Malondialdehyde (MDA) were evaluated.

The results showed a weight loss of (8 to 10g) in mice treated with hydro-methanolic pomegranate bark extract as well as those exposed to pesticides. In mice treated with DM and LCT, kidney weight increased significantly (0.4%) compared to the control lot. Changes in biochemical and enzymatic parameters could be observed with an increase of (0.31 mg/ml) in protein levels in batches treated with the two pesticides and their mixture in addition to a decrease of (30 mg/ml) in fat content and (2.9 mg/ml) carbohydrates.

Also a significant increase of (0.4  $\mu\text{g}/\text{min}/\text{mg}$  protein) in GPx enzyme activity, an (105  $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$  protein) CAT and (0.25  $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$  protein) in MDA content indicating significant lipid peroxidation.

Treatment with pomegranate hydro-methanolic extract at a dose of 1.38 mg/kg, we observed an improvement in most of the parameters studied, which means that this extract reduces the damage caused by lambda-cyhalothrin and deltamethrin

**The key word:** Oxidative stress, lambda-cyhalothrin, deltamethrin, kidney, *Mus musculus*.

الغرض من هذا العمل هو دراسة التأثير الوقائي للمستخلص الميثانولي لقشور الرمان ضد السمية الكلوية الناجمة عن مبيدين زراعيين هما لامدا سيالوثرين (LCT) وديلتاميثرين (DM).

أجريت التجربة على عينة مكونة من 32 فأر (إناث وذكور) يتراوح وزنها بين 25 و 45 غ وتتراوح أعمارها بين 2 و 3 أسابيع، مقسمة إلى ثمانية مجموعات تحتوي كل مجموعة على أربعة فئران. المجموعة الأولى شاهدة تلقت الماء المقطر فقط طيلة مدة التجربة، المجموعات الأخرى تعالج بجرعة 1,38 مغ/كغ من المستخلص الهيدروميثانولي لقشور الرمان والمبيدين، لوحدهم أو في خليط، بجرعات تقدر بـ 8,96 مغ/كغ من الدلتاميثرين و 1,5 مغ/كغ من لامدا-السيهالوثرين عن طريق الفم لمدة 15 يومًا.

تم تقييم خصائص نمو الفئران "الوزن والوزن النسبي للكلية". بعد الذبح تم تقييم مستويات كل من: الدهون والبروتينات والجليسيدات على مستوى الكلية وكذلك خصائص الإجهاد التأكسدي بما في ذلك الخصائص الأنزيمية: الجلوتاثيون بيروكسيداز (GPx) والكاتالاز (CAT) وغير الأنزيمية: مالونديالدهيد (MDA).

أظهرت النتائج فقدان في الوزن من (8 إلى 10 غ) لدى الفئران التي عولجت بالمستخلص الميثانولي لقشور الرمان وكذلك المعالجة بالمبيدين.

في الفئران التي عولجت بـ DM و LCT، زاد وزن الكلية بشكل ملحوظ بنسبة (0,4%) مقارنة مع المجموعة الشاهدة. وقد لوحظت تغييرات في الخصائص البيوكيميائية والإنزيمية مع زيادة مستوى تركيز البروتين في الكلية حوالي (0,31 مغ/مل) لدى المجموعات المعالجة بالمبيدات ومزيجها بالإضافة إلى انخفاض على مستوى الدهون حوالي (30 مغ/مل) والجليسيدات (2,9 مغ/مل) مقارنة بالمجموعة الشاهدة.

حيث بينت النتائج ارتفاع بشكل ملحوظ في نشاط الإنزيمات المضادة GPx بحوالي (0,4 ميكروغرام/دقيقة/مغ) و CAT بـ (105 ميكرومول/دقيقة/مغ)، مع ارتفاع في MDA بـ (0,25 ميكرومول/دقيقة/مغ) الذي يعتبر مؤشر حيوي لبيروكسيد الدهون.

أما عند المعالجة بالمستخلص الهيدروميثانولي لقشور الرمان بجرعة 1,38 مغ/كغ، لاحظنا تحسن في المؤشرات وهذا يعني أن هذا المستخلص يخفف الضرر الناتج عن كل من الدلتاميثرين واللامدا سيالوثرين.

ومن هنا يمكننا القول أن المستخلص الهيدروميثانولي لقشور الرمان مضاد للأكسدة وفعال في الموازنة بين الجذور الحرة والنظام المضاد لأكسدة الجسم.

**الكلمات المفتاحية:** الإجهاد التأكسدي، لامدا-السيهالوثرين، الدلتاميثرين، الكلية، ميس ميسكيليس.

# *Remerciement*

*Louage à **DIEU** le tout puissant qui nous a donné le courage, la volonté et la force pour accomplir ce modeste travail.*

\*\*\*\*\*

*Nos reconnaissances vont tout d'abord au Docteur **MENACEUR Fouad** qui nous a honorés en acceptant de diriger ce travail. Nous le remercions pour son encadrement rigoureux et méthodique et les compétences dont il nous a fait bénéficier le long de tout ce travail. Nous lui adressons également notre gratitude pour son aide précieuse et d'avoir été là pour nous, par ses conseils fructueux, son soutien continu et ses encouragements permanents. Merci de nous avoir guidées avec patience et d'avoir consacré autant d'heures pour les corrections de ce manuscrit.*

\*\*\*\*\*

*Nous adressons nos remerciements aux membres du jury pour avoir accepté d'évaluer ce travail en dépit de leurs nombreuses autres obligations. Nos sincères remerciements vont à Mr **SOLTANI Nedjmeddine** Maître Assistant à l'Université de Tébessa, qui a bien voulu accepter de présider ce jury. Nous tenons à exprimer nos très grandes considérations à Mr **GASMI Salim** Maître Assistant à l'Université de Tébessa qui nous a fait l'honneur d'examiner ce mémoire et de nous faire ainsi bénéficier de sa compétence et de ses connaissances. Nous le remercions aussi pour ses conseils et son aide toute la période de réalisation de ce travail.*

\*\*\*\*\*

*Nos spéciaux remerciements reviennent à Mr **BEN AICHA Brahim**, pour son soutien continu et ses précieux conseils et pour leur gentillesse et leur aide précieuse. Merci de nous avoir guidées avec patience et d'avoir consacré autant d'heures pour la réalisation de ce travail.*

\*\*\*\*\*

*Nos vifs remerciements aussi à Mme **MEBARKIA Nadjwa** et M<sup>elle</sup> **AOUNALLAH Samira** pour leurs aides durant toute la période de réalisation de ce travail.*

\*\*\*\*\*

*Nos remerciements iront également au département de biologie appliquée et des êtres vivants.*

\*\*\*\*\*

*Finalement, nous remercions tous ceux ou celles qui ont contribué de près ou de loin à l'accomplissement de ce mémoire.*

# *Dédicace*

*Je dédie ce modeste travail :*

*A mon chère, mon soutien moral, la source de mes efforts, celui que j'aime beaucoup, que dieu te garde dans son vaste paradis, à toi mon oncle **Seif Eddine***

*A l'homme de ma vie, mon exemple éternel, mon soutien moral et source de joie et de bonheur, celui qui s'est toujours sacrifié pour me voir réussir, à toi **mon père**.*

*A la lumière de mes jours, la source de mes efforts, la flamme de mon cœur, ma vie et mon bonheur ; **maman** que j'adore.*

*A ceux que j'aime beaucoup et qui m'a soutenue tout au long de ce projet : mes chères frères **Oussama, Mahmoud et Yahia**.*

*A ma sœur **Raina**.*

*A mes belles **Fatouma, Balkis**.*

*A mon grand-père : **Belgacem**.*

*A tous mes chères **Tahar, Adel, Bachir, Khaled, Tarek, Lhadi**.*

*A toutes mes chères **Sana, Souad, Sara, Lilet, Mira, Zahia, Linda**.*

*A ma deuxième famille **Khelladi**.*

*A toutes mes **amies**.*

*A mon binôme **Rania**.*

*A tous les étudiants de ma promotion.*

*A ceux qui m'ont soutenu, m'ont encouragé durant toute ma période d'étude, et pour leurs consentis.*

**FERDI Amina**

# *Dédicace*

*Avant toute chose je remercie Allah le tout puissant de m'avoir donné la santé, la patience et le courage pour réaliser ce travail.*

*C'est avec beaucoup de respect et tant d'amour je dédie ce travail à tous ceux qui ont participé à son accomplissement.*

*A mon père*

*Qui m'a toujours soutenu tant matériellement que moralement, et qui m'a offert plus que le nécessaire pour que je puisse mener mes études dans les meilleures conditions possibles*

*A ma mère*

*A vous cher maman, mon grand regret est que vous soyez parti très tôt avant d'avoir bénéficié des fruits de vos efforts investis en nous*

*A mes frères Housseem, Sami, Wassim et Taki*

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

*A ma chère sœur, Aya*

*La vie m'a fait un très beau cadeau en faisant de toi Ma sœur.*

*A mes très chers amies Rokaya et Sara*

*A mon binôme Amina*

*A toute ma famille GACEM*

*A tous les étudiants de ma promotion*

**GACEM Rania**

## Liste des abréviations

---

**ε** : Coefficient d'extinction du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

**μl**: Microlitre

**APG**: Angiosperm Phylogeny group

**BBC** : Bleu Brillant de Coumassie

**BHT**: Butyl hydroxy toluene.

**BSA**: Sérumalbumine bovine

**CAD** : Cinnamyl alcool déshydrogénase

**CAT** : Catalase

**CCR** : Cinnamate CoA réductase

**CHI** : Chalcone flavanone isomérase

**CHS** : Chalcone synthase

**COX** : cyclo-oxygénases

**CPP** : produits phytosanitaires. *Comité*

**DM** : Deltaméthrine

**DO** : Densité optique

**DTNB** : Acide 5'-dithio-bis-2-nitrobenzoïde.

**EHM** : Extrait hydro-méthanolique

**EOA** : Espèces oxydant activées

**ERA** : espèces réactives de l'azote

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

**Ext** : Extrait hydro-méthanolique de grenadier

**FRO** : Formes réactives de l'oxygène

**g** : gramme

**GPx** : Glutathion peroxydase

## Liste des abréviations

---

**Grx** : Glutaredoxines

**GSH** : Glutathion

**GSH** : produits finaux de glycosylation

**GSSG** : Glutathion oxyde

**H<sub>2</sub>O** : Molécule d'eau

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

**HCl** : Acide chlorhydrique

**INSERM** : Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale

**L** : Longueur de la cuve utilisée

**Lacc**: Laccases

**LCT**: Lambda cyhalothrine

**LDL**: low density lipoproteins

**M** : Molarité

**MDA** : Acide Malon-dialdéhyde

**mg** : Milligramme

**min** : Minute

**mM** : Millimol

**Na<sub>2</sub>HPO** : Phosphate d'hydrogène de sodium

**NaOH** : Hydroxyde de sodium

**nm**: Nanomètre

**NO**: oxide d'azote

**NO<sub>2</sub>**:dioxyde d'azote

**O<sub>2</sub>** : Dioxygène

**C°** : Degrés Celsius

## Liste des abréviations

---

**OECD** : Organisation de coopération et de développement économiques.

**PAL** : Phénylalanine ammonialyase

**PH** : Potentiel hydrogen

**PPO** : Polyphénol oxydases

**Pr** : Poids du rein (mg)

**PRr** : Poids relatif du rein (mg)

**Prx** : Peroxyredoxine

**PT** : Poids total de souris (g)

**R** : Rendement

**SOD**: Super oxyde-dismutase

**TAL**: Tyrosine ammonialyase

**TBA**: Acide thiobarbiturique

**TBS**: Tert-butyldiméthylsilyle

**TBS**: Tris-buffered saline

**TCA** : Acide trichloracétique

**Tris** : Tris-hydroxy méthyl amino-méthane

**tr** : tours

**tr/min** : tours par minute

**Vs** : Volume du surnageant

**Vt** : Volume total

## Liste des figures

Figure	Titres	Pages
<b>Figure 1</b>	Structure chimique et caractéristique de certains exemples de pyrethriinoïdes.	08
<b>Figure 2</b>	Modes d'exposition de l'homme et des milieux par les pesticides	14
<b>Figure 3</b>	La grenade et ses différentes parties.	21
<b>Figure 4</b>	Composés phénoliques à faible poids moléculaire de grenadier	26
<b>Figure 5</b>	Les grandes lignes de la biosynthèse des principaux groupes de composés	39
<b>Figure 6</b>	Anatomie interne du rein	43
<b>Figure 7</b>	Organisation structurale du néphron rénal.	44
<b>Figure 8</b>	Ecorce de grenade et poudre d'écorce séchée	47
<b>Figure 9</b>	Les souris « <i>Mus musculus</i> »	48
<b>Figure 10</b>	Conditions d'élevage des souris	49
<b>Figure 11</b>	Les pesticides et l'extrait utilisés pour l'expérimentation	49
<b>Figure 12</b>	L'extraction méthanolique de l'écorce de <i>Punica granatum</i>	51
<b>Figure 13</b>	Traitement des souris	52
<b>Figure 14</b>	Sacrifice et prélèvement des reins	53
<b>Figure 15</b>	Schéma récapitulatif du protocole expérimental	54
<b>Figure 16</b>	Extraction et dosage des glucides, protéines et lipides totaux	56
<b>Figure 17</b>	Mécanisme réactionnel de l'MDA	61
<b>Figure 18</b>	L'évaluation du poids corporel (PC) chez les différents lots traités par les pesticides et l'extrait durant 15 jours du traitement.	64
<b>Figure 19</b>	L'évaluation du gain de poids corporel (GP) chez les souris témoins et traités par les pesticides et l'extrait durant 15 jours du traitement.	64
<b>Figure 20</b>	L'évaluation du poids relatif des reins (PRr) chez les souris traités par les pesticides et l'extrait durant 15 jours du traitement.	65
<b>Figure 21</b>	Taux de protéines (mg/ml) dans les reins chez les souris des différents lots expérimentaux durant 15 jours de traitement.	66
<b>Figure 22</b>	Taux des glucides (mg/ml) dans les reins chez les souris des différents lots expérimentaux pendant 15 jours de traitement.	67
<b>Figure 23</b>	Taux des lipides (mg/ml) dans les reins chez les souris des différents lots expérimentaux pendant 15 jours de traitement.	68
<b>Figure 24</b>	L'évaluation de l'activité de la GPx ( $\mu\text{g}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines) chez les	69

## Liste des figures

	souris traitées par les pesticides et l'extrait durant 15 jours du traitement.	
<b>Figure 25</b>	L'évaluation de l'activité de la CAT ( $\mu\text{g}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines) chez les souris traitées par les pesticides et l'extrait durant 15 jours du traitement.	70
<b>Figure 26</b>	La teneur de la malondihaldéhyde MDA ( $\mu\text{M}/\text{mg}$ lipide) dans les reins des souris traitées par les pesticides et l'extrait durant 15 jours du traitement.	71

## Liste des tableaux

<b>Tableau</b>	<b>Titres</b>	<b>Pages</b>
<b>Tableau 1</b>	Formes des bio-pesticides	07
<b>Tableau 2</b>	Principales propriétés de Lambda-cyhalothrine	10
<b>Tableau 3</b>	Principales propriétés physico-chimiques de la deltaméthrine	11
<b>Tableau 4</b>	Produits chimiques agricoles y compris les pesticides et leur activité	12
<b>Tableau 5</b>	Les effets néfastes des pesticides sur l'environnement	16
<b>Tableau 6</b>	Principaux composés phénoliques du grenadier avec leurs structures	37
<b>Tableau 7</b>	Classification des souris	48

## Table des matières

<b>INTRODUCTION</b>	
<b>PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	
<b>Chapitre 1: Généralités sur les pesticides</b>	
<b>1. Généralités.....</b>	<b>04</b>
<b>2. Définition.....</b>	<b>04</b>
<b>3. Historique.....</b>	<b>04</b>
<b>4. Classification .....</b>	<b>05</b>
<b>4.1. Classification selon leur cible.....</b>	<b>05</b>
<b>4.2. Classification selon la nature.....</b>	<b>06</b>
<b>4.2.1. Les bio-pesticides.....</b>	<b>06</b>
<b>4.2.2. Les pesticides chimiques.....</b>	<b>07</b>
<b>4.2.2.1. Les pesticides inorganiques.....</b>	<b>07</b>
<b>4.2.2 .2. Les pesticides organo-métalliques.....</b>	<b>07</b>
<b>4.2.2.3. Les pesticides organiques.....</b>	<b>07</b>
<b>4.2.3. Les pyrèthrinoides.....</b>	<b>08</b>
<b>4.2.3.1. Lambda-cyhalothrine.....</b>	<b>09</b>
<b>4.2.3.2. Deltaméthrine.....</b>	<b>10</b>
<b>4.3. Classification selon l'utilisation.....</b>	<b>11</b>
<b>5. L'intérêt d'utilisation des pesticides.....</b>	<b>12</b>
<b>6. Mode d'action des pesticides.....</b>	<b>13</b>
<b>7. Modes possibles d'expositions de l'homme aux pesticides.....</b>	<b>13</b>
<b>7.1. Exposition professionnelle.....</b>	<b>14</b>
<b>7.2. Exposition non professionnelle.....</b>	<b>14</b>
<b>8. La toxicité des pesticides.....</b>	<b>14</b>
<b>8.1. Les facteurs influençant la toxicité des pesticides.....</b>	<b>14</b>
<b>8.2. Les voies d'exposition aux pesticides.....</b>	<b>14</b>
<b>8.3. Les effets des pesticides sur l'environnement.....</b>	<b>15</b>
<b>8.4. Les effets des pesticides sur la santé.....</b>	<b>16</b>
<b>8.4.1. Intoxication aiguë.....</b>	<b>16</b>
<b>8.4.2. Intoxication chronique.....</b>	<b>17</b>
<b>9. Devenir d'un toxique dans l'organisme.....</b>	<b>17</b>

<b>Chapitre 2 : L'espèce végétale étudiée : le grenadier</b>	
<b>1. Généralités .....</b>	<b>19</b>
<b>1.1. Origine du nom.....</b>	<b>19</b>
<b>1.2. Répartition géographique.....</b>	<b>19</b>
<b>2. Historique.....</b>	<b>19</b>
<b>3. Présentation et description botanique du grenadier .....</b>	<b>20</b>
<b>4. Grandier dans le règne végétal.....</b>	<b>21</b>
<b>4.1. Classification du <i>Punicagranatum</i> .....</b>	<b>21</b>
<b>4.1.1. Classification du <i>Punicagranatum</i>L. 1753.....</b>	<b>21</b>
<b>4.1.2. Classification APG II (2009).....</b>	<b>21</b>
<b>5.Composition chimique des différents organes du grenadier.....</b>	<b>22</b>
<b>5.1. L'écorce.....</b>	<b>22</b>
<b>5.2. Les feuilles.....</b>	<b>22</b>
<b>5.3. Les fleurs.....</b>	<b>22</b>
<b>5.4. Le fruit.....</b>	<b>22</b>
<b>6. Les différentes utilisations du grenadier .....</b>	<b>22</b>
<b>6.1. Utilisation dans l'industrie agroalimentaire.....</b>	<b>22</b>
<b>6.2. Utilisation dans l'industrie cosmétique.....</b>	<b>22</b>
<b>7. Propriétés thérapeutiques du grenadier.....</b>	<b>23</b>
<b>7.1 Protection contre la néphrotoxicité.....</b>	<b>23</b>
<b>7.2. Activité antioxydante.....</b>	<b>23</b>
<b>7.3. Activité ant-inflammatoires.....</b>	<b>23</b>
<b>7.4. Activité anticancéreuse.....</b>	<b>23</b>
<b>7.5. Activité antidiabétique de <i>P. granatum</i>.....</b>	<b>24</b>
<b>7.6. Activité antimicrobiennes du grenadier.....</b>	<b>24</b>
<b>7.7. Activité antiulcéreuse.....</b>	<b>24</b>
<b>7.8. Action cicatrisante du grenadier.....</b>	<b>24</b>
<b>7.9. Autres propriétés du grenadier.....</b>	<b>25</b>
<b>8. Composés Phénoliques du Grandier.....</b>	<b>25</b>
<b>8.1 Composés phénoliques à faible poids moléculaire .....</b>	<b>25</b>
<b>8.2Composés phénoliques à poids moléculaire élevé.....</b>	<b>26</b>
<b>Chapitre 3 : Stress oxydatif</b>	
<b>1. Généralité sur Stress oxydatif.....</b>	<b>28</b>

## Table des matières

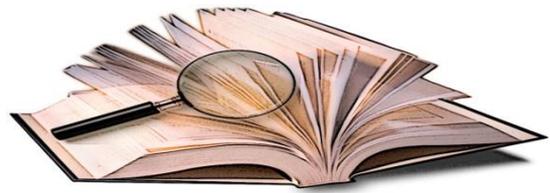
2. définition des radicaux libre.....	28
3. Origine des radicaux libres.....	28
3.1. Origine endogène.....	28
3.2. Origine exogène.....	29
4. Type de radicaux libre.....	29
5. Conséquences du stress oxydant.....	29
5. 1. Peroxydation lipidique.....	29
5.2. Oxydation des protéines.....	29
5.3. Oxydation des lipoprotéines.....	30
5.4. Oxydation des glucides.....	30
6. Les défenses antioxydantes.....	30
6.1. Système antioxydant enzymatique.....	30
6.1.1. Les glutathion peroxydases.....	31
6.1.2. Les superoxydesdismutases.....	31
6.1.3. Peroxyredoxine.....	31
6.1.4. Glutaredoxine.....	31
6.2. Système antioxydant non enzymatique.....	32
6.1.1. La catalase (CAT).....	32
6. 2.2. Polyphénols .....	32
6. 2.3. Les caroténoïdes.....	32
6.2.4. L'ubiquinol (Coenzyme Q10).....	33
6.2.5. Glutathion.....	33
6.2.6. La vitamine C.....	33
6.2.7. Vitamine E.....	33
<b>Chapitre 4 : Les polyphénols</b>	
1. Généralités sur Les polyphénols.....	36
2. Structures chimiques et classification.....	36
3. Biosynthèse.....	37
4. Rôle des polyphénols dans les plantes.....	38
5. Les polyphénols comme antioxydants.....	39
<b>Chapitre 5 : Rein en toxicologie</b>	
1. Définition.....	41
2. Morphologie et Anatomie .....	41

## Table des matières

3. Unité structurale du rein .....	42
4. Développement du rein.....	43
5. Rein et l'élimination des toxiques.....	43
<b>PARTIE PRATIQUE</b>	
<b>Matériels et méthodes</b>	
I-Matériels et méthodes.....	46
I-1.Matériels.....	46
I-1.1.Matériel végétale.....	46
I-1.2.Matériel animal.....	46
I-1.2.1. Entretien des animaux.....	47
I-1.2.2. Mesure de poids.....	48
I-1.2.3. Choix des doses .....	48
I-1.3.Matériels chimoques.....	49
I-2.Méthodes.....	49
I-2.1.Réalisation de l'extrait hydro-méthanolique.....	49
I-2.2.Rendement d'extraction.....	51
I-2.3.Traitement des souris.....	51
I-2.4. Sacrifice et prélèvement des reins .....	52
I.2.5. Poids relatif des reins.....	53
I-2.6. Préparation des solutions.....	54
I-3. Analyse des paramètres biochimiques .....	54
I-3.1. Dosage des métabolites (glucides,protéines,lipides) .....	54
I-3.1.1.Dosage de protéine .....	56
I-3.1.2. Dosage de glucide .....	56
I-3.1.3.Dosage de lipide.....	56
I-4.Analyse des paramètres enzymatiques .....	57
I-4.1. Dosage de l'activité du GlutathionPeroxydase (GPx).....	57
I-4.2. Dosage de l'activité catalase (CAT).....	58
I-5.Analyse des paramètres non enzymatiques .....	59
I-5.1. Dosage de malondialdéhyde (MDA) .....	59
I-6. Analyse statistique.....	60
<b>Résultats et discussion</b>	
II. Résultats.....	62

## Table des matières

<b>II.1. Résultat de rendement de l'extrait.....</b>	<b>62</b>
<b>II.2. Effets des pesticides et de l'extrait hydro-méthanolique de l'écorce de la grenade sur les paramètres de croissance globale des souris .....</b>	<b>62</b>
<b>II.2.1. Poids corporel.....</b>	<b>62</b>
<b>II.2.2. Gain de poids.....</b>	<b>63</b>
<b>II.2.3. Poids relatif.....</b>	<b>64</b>
<b>II.3. Étude des paramètres biochimiques, enzymatiques et non enzymatique .....</b>	<b>65</b>
<b>II.3.1. Effets des pesticides et de l'extrait hydro-méthanolique de l'écorce de la grenade sur les paramètres biochimiques chez les souris.....</b>	<b>65</b>
<b>II.3.1.1. Taux des protéines.....</b>	<b>65</b>
<b>II.3.1.2. Taux des glucides .....</b>	<b>66</b>
<b>II.3.1.3. Taux des lipides.....</b>	<b>67</b>
<b>II.3.2. Effets des pesticides et de l'extrait hydro-méthanolique de l'écorce de la grenade sur les paramètres enzymatiques du stress oxydant chez les souris.....</b>	<b>68</b>
<b>II.3.2.1. Effet des pesticides et de l'extrait hydro-méthanolique de l'écorce de la grenade sur les variations de l'activité de la GPx.....</b>	<b>68</b>
<b>II.3.2.2 Effet des pesticides et de l'extrait hydro-méthanolique de l'écorce de la grenade sur les variations de l'activité de la CAT.....</b>	<b>69</b>
<b>II.3.3. Effet des pesticides et de l'extrait hydro-méthanolique de l'écorce de la grenade sur les paramètres non enzymatiques du stress oxydant chez les souris.....</b>	<b>70</b>
<b>II.3.3.1. Effet des pesticides et de l'extrait hydro-méthanolique de l'écorce de la grenade sur le teneur de la malondialdéhyde MDA.....</b>	<b>70</b>
<b>III- Discussion.....</b>	<b>71</b>
<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>75</b>
<b>Références bibliographiques</b>	
<b>Annexes</b>	



---

# Introduction

## Introduction

---

Le terme ‘pesticide’ est utilisé pour désigner les produits chimiques agricoles utilisés à des fins phytosanitaires. Un pesticide est une substance qui est sensée prévenir, détruire, repousser ou contrôler tout ravageur animal et toute maladie causée par des micro-organismes ou encore des mauvaises herbes indésirables (**Boland et al., 2004**). Les pesticides agricoles contribuent à augmenter la productivité agricole, mais posent dans le même temps des risques potentiels pour la santé humaine et l’environnement (**OECD, 2008**).

Les pyréthrinoïdes sont des insecticides utilisés pour lutter contre les parasites des grandes cultures et contre les parasites des arbres fruitiers et les légumes (**Toumi, 2013**). La lambda-cyhalothrine et deltaméthrine sont parmi les pyréthrinoïdes les plus largement utilisés tant en usage agricole que domestique (**Schleier et Peterson, 2012**).

Le stress oxydatif est défini comme étant une oxydation excessive due à un déséquilibre entre la production d'espèces oxydantes ou formes réactives de l'oxygène (FRO) et celle des systèmes antioxydants. Les FRO sont produites au cours de divers processus biologiques par un grand nombre de cellules (**Pasquier, 1995**).

Le développement de nouveaux antioxydants d’une bonne capacité antioxydante s’avère indispensable pour lutter contre les phénomènes d’oxydations. Dans ce but, l’investigation des plantes représente un potentiel inestimable pour la découverte de nouvelles substances à caractère antioxydant, si l’on considère que ces plantes peuvent contenir des centaines, voire des milliers de métabolites secondaires. Ces derniers représentés actuellement par 100 000 substances identifiées, pourraient être utilisés dans la prévention de certaines maladies (**Cowan, 1999**).

Le grenadier (*Punica granatum* L.), est une espèce fruitière pérenne de la famille des Punicaceae ayant une grande valeur nutritionnelle, c’est une source importante de minéraux, vitamines et en composés phénoliques très utilisées en médecine traditionnelle en Algérie. La plupart des parties du fruit sont connues pour leur important potentiel antioxydant notamment l’écorce du fruit (**Seeram et al., 2006**).

Dans ce travail, nous examinons l’étendue de l’effet toxique des pesticides sur l’organisme et l’effet opposé de l’extrait hydro-méthanolique de l’écorce de *Punica granatum* sur le traitement du stress oxydatif chez les souris sur leurs fonctions rénales. A cette fin, nous étudierons lambda-cyhalothrine et deltaméthrine choisis comme modèles des pesticides.

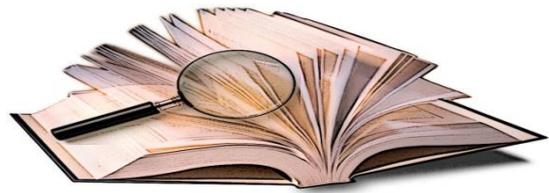
## Introduction

---

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 pesticides et leur toxicité en mettant l'accent sur les deux produits étudiés lambda-cyhalothrine et deltaméthrine. Un deuxième chapitre qui étudie la plante utilisée *Punica granatum*. Le troisième chapitre traite les mécanismes et conséquences du stress oxydant. Le quatrième chapitre est consacré à l'étude des polyphénols, Alors que le cinquième chapitre explore le rein et la fonction rénale.

La partie expérimentale de ce travail est consacrée aux détails de l'ensemble des matériels animal, végétal et chimique utilisés ainsi que la présentation des différentes méthodes et techniques employées pour l'estimation des paramètres de croissance des souris (Poids corporel, gain de poids, poids relatif) et le dosage des paramètres biochimiques ainsi que l'évaluation des paramètres du stress oxydant non-enzymatique et enzymatique.

Et enfin, nous discuterons l'ensemble des résultats obtenus dans ce manuscrit de travail et nous terminerons par une proposition des différentes actions que nous pourrions mener dans le futur pour améliorer ce travail.



## *Partie bibliographique*

---

### *Chapitre 1*

### *Les pesticides*

### 1. Généralités :

Les pesticides désignent les substances actives et préparation contenant une ou plusieurs substances actives qui sont présentées sous la forme dans laquelle elles sont livrées à l'utilisateur et qui sont destinées à :

- Protéger les végétaux ou produits végétaux contre tous les organismes nuisibles ou à prévenir leur action.
- Exercer une action sur les processus vitaux des végétaux.
- Assurer la conservation des végétaux.
- Détruire les végétaux indésirables ; ou détruire les parties de végétaux, freiner ou prévenir une croissance indésirable des végétaux
- Malgré leurs immenses bienfaits, les pesticides ne sont pas sans inconvénients. Nombre de ces produits chimiques sont toxiques à l'égard des organismes vivants et portent atteinte à certains systèmes biochimiques. Comme il y en a de semblables dans tous les organismes vivants, il s'ensuit qu'un produit chimique qui tue une mouche risque aussi de tuer un chien. Il faut donc, non seulement dans l'élaboration d'un produit chimique, mais aussi dans son emploi, tenir compte du fait qu'il peut empoisonner un organisme auquel il n'est pas destiné (**Jean & Malausan, 2002 ; Jean-Noël et al., 2005**).

### 2. Définition :

Le terme pesticide, dérivé du mot anglais pest (chose nuisible). La terminaison du nom pesticide, en « cide », indique qu'il a pour fonction de tuer les êtres vivants (**Inserm, 2013**).

Les pesticides sont des substances chimiques ou naturelles utilisées pour protéger des végétaux (plante, arbres, fruits) contre des nuisibles. Les pesticides naturels ou biologiques protègent les végétaux de manière entièrement naturelle grâce à l'introduction d'une autre espèce telle qu'un insecte ou un champignon, parasite, mauvaise herbe (**Vincent et al., 2000**).

### 3. Historique :

L'utilisation de produits chimiques est malgré tout assez ancienne comme l'indique l'emploi du soufre cité par Homère et celle de l'arsenic signalé par Pline l'Ancien. (**Calvet et al., 2005**). Vers 1690, La Quintinie (1626-1688), arrosait de jus de tabac des poiriers attaqués par le Tigre. Le 26 Ventôse An IV (16 mars 1796) la lutte contre les insectes ravageurs fait l'objet d'une loi. (**Mehmet et al., 2007**). Les traitements insecticides, fongicides et herbicides

apparaissent et prennent une grande importance au cours du XIXe siècle en raison du développement de graves épidémies qui atteignent des productions agricoles vitales. Deux périodes peuvent être distinguées pour décrire le développement très important des pesticides ; ce sont la première et la deuxième moitié du XXe siècle approximativement séparées par la deuxième guerre mondiale (Calvet ; et *al.*, 2005).

Au XIXe siècle le recours à la chimie s'impose, avec les succès du soufre dans la lutte contre l'oïdium, dus à Henri Marés. La loi du 19 juillet 1845 sur la vente des substances vénéneuses, suivie des ordonnances royales des 29 octobre et 6 novembre 1846, vient réglementer, entre autres, la vente de l'arsenic et de nicotine. Dès 1869 le baron Paul Thenard avait expérimenté le sulfure de carbone contre le phylloxéra. En 1883, Pulliat, à Chiroubles, constate que le sulfate de cuivre protège les ceps du mildiou (Mehmet et *al.*, 2007).

1930 marque les débuts des pesticides organiques de synthèse. Les dithiocarbamates (1934), le DDT (1939), le 2, 4-D (1943), le malathion (1950), le paraquat (1958), le carbaryl, les benzimidazoles, la deltaméthrine, les phéromones, le phoséthyl-aluminium, les IBS, les sulfonylurées et les strobilurines vont successivement enrichir la panoplie des molécules phytosanitaires, avec leur lot d'espoir et de désillusions. Vers 1850, se développent les usages insecticides de la roténone et du pyrèthre. En 1952, la recherche de Geigy découvre les propriétés herbicides des s-triazines. Leurs sélectivités sont rapportées en 1955. En 1966 apparaissent les fongicides de la famille des benzimidazoles, comme le bénomyl, et de celle des pyrimidines, comme l'éthirimol. A partir de 1974 se développent les insecticides pyrèthrinoides, construits sur le modèle des composés du pyrèthre. (Mehmet *et al.*, 2007).

#### 4. Classification :

Il existe trois façons de classer les pesticides : par les organismes vivants visés, par leurs natures, et par leurs usages, les trois sont utiles mais ne répondent pas aux mêmes préoccupations (Calvet et *al.*, 2005).

##### 4.1. Classification selon leur cible :

Les pesticides peuvent être regroupés selon leurs cibles principales (Inserm, 2013) :

- Les fongicides sont utilisés pour protéger les plantes et les animaux cultures de champignons (Inserm, 2013).
- Les herbicides sont utilisés pour tuer les plantes adventices, de manière à libérer des plantes cultivées souhaitées de la concurrence (Inserm, 2013).

- Les insecticides sont utilisés pour tuer les insectes nuisibles et les vecteurs de maladies humaines mortelles telles que le paludisme, la fièvre jaune, trypanosomais, la peste et le typhus (**Inserm, 2013**).
- Les acaricides sont utilisés pour tuer les acariens, qui sont nuisibles en agriculture, et les tiques, qui peuvent transporter l'encéphalite de l'homme et des animaux domestiques (**Inserm, 2013**).
- Les molluscicides sont utilisés contre les escargots et les limaces, qui peuvent être importants ravageurs des plantations d'agrumes et de jardins de légumes et de fleurs (**Inserm, 2013**).
- Les nématicides sont utilisés pour tuer les nématodes, qui peuvent être importants parasites des racines des plantes cultivées (**Inserm, 2013**).
- Les rodenticides sont utilisés pour lutter contre les rats, les souris, les gaufres et autres rongeurs nuisibles de l'agriculture de l'habitation humaine (**Inserm, 2013**).
- Les avicides sont utilisés pour contrôler les oiseaux, qui sont parfois considérés comme des ravageurs dans l'agriculture (**Inserm, 2013**)

#### **4.2. Classification selon la nature :**

##### **4.2.1. Les bio-pesticides :**

Les bio-pesticides organismes vivants ou produits issus de ces organismes ayant la particularité de supprimer ou limiter les ennemis des cultures (**Deravel et al, 2014**). Parmi les méthodes de lutte biologique, les bio-pesticides (tableau 1) occupent une place de choix car ils se prêtent souvent à la production de masse requise pour l'industrie et ils s'appliquent avec un pulvérisateur conventionnel ce qui en facilite l'adoption par les producteurs agricoles. Ils sont généralement compatibles avec des méthodes de lutte biologique classiques (ex. lâchers de prédateurs ou de parasites), même s'ils peuvent avoir des effets néfastes sur les organismes utiles. Les bio-pesticides peuvent être à base de bactéries, champignons, virus, nématodes et d'extraits de plantes (**Vincent et al., 2000**).

Tableau 1 : Formes des bio-pesticides (Vincent et al., 2000).

Biopesticides	Exemple
Bactéries entomopathogènes	<i>Bacillus thuringiensis</i>
Mycopesticides	<i>Metarhiziumanisopliae</i> et <i>M. flavoviride</i> <i>Beauveria bassiana</i> , <i>B. brognardtii</i> , etc.
Virus entomopathogènes	Baculovirus (carpovirusine)
Bioherbicides	<i>Colletotrichum</i> sp (Waage, 1995)
Microorganismes antagonistes de maladies	<i>Trichoderma</i> viridae; <i>Gliocladium</i> sp; <i>Pseudomonas</i> sp.
Nématodes entomopathogènes	Genres <i>Steinernema</i> et <i>Heteroabditis</i>

#### 4.2.2. Les pesticides chimiques :

Il existe trois catégories de pesticides (Calvet et al., 2005).

##### 4.2.2.1. Les pesticides inorganiques :

Les pesticides inorganiques ne contiennent pas de carbone dans le cadre de leur composition chimique. Ces composés ont généralement des poids moléculaires relativement faibles et contiennent souvent moins de 10 atomes (Pimentel., 2002). Ils sont peu nombreux mais certains sont utilisés en très grandes quantités comme le soufre et le cuivre (Calvet et al, 2005).

##### 4.2.2.2. Les pesticides organo-métalliques :

Ce sont des fongicides dont la molécule est constituée par un complexe d'un métal tel que le zinc et le manganèse et d'un anion organique dithiocarbamate. Des exemples de ces pesticides sont le mancozèbe (avec le zinc) et le manèbe (avec le manganèse) (Calvet et al., 2005).

##### 4.2.2.3. Les pesticides organiques :

Les composés organiques sont constitués d'enchaînements d'atomes de carbone sur lesquels se greffent ou entre lesquels s'intercalent des atomes d'autres éléments : hydrogène, oxygène, azote, chlore, fluor, phosphore, silicium... la plupart des composés organiques sont constitués de groupes identiques d'atomes, individualisés et non chargés, appelés molécules les ions organiques sont des groupements d'atomes qui ont perdu ou gagné un (des) électron(s), ils sont nécessairement associés à un contre-ion de signe opposé (Jean & Malausa, 2002). On distingue comme principales familles: organochlorés, organophosphorés, carbamates,

thiocarbonates, pyrethrinoides, urées substituées, phenoxyherbicides, triazines, phtalimides, pyridines (Inserm, 2013).

#### 4.2.3. Les pyréthrinoides :

##### Généralités

Les pyréthrinoides sont des insecticides largement utilisés dans la production agricole partout dans le monde. Ces insecticides lipophiles sont appliqués en remplacement des organophosphorés, en raison de leur plus faible volatilité et leur inactivation métabolique rapide (Barr *et al.*, 2010).

Les pyréthrinoides constituent des insecticides encore très employés puisqu'en 2008 ; ils représentaient 15,1% du marché mondial des insecticides (Bodereau-Dubois, 2011). Ils sont très utilisés en Afrique sub-saharienne pour lutter contre la malaria (Adamou *et al.*, 2010). Cette large utilisation s'explique par leur grande et rapide efficacité pour les insectes avec une relative innocuité pour les mammifères et les oiseaux (Sayeed *et al.*, 2003).

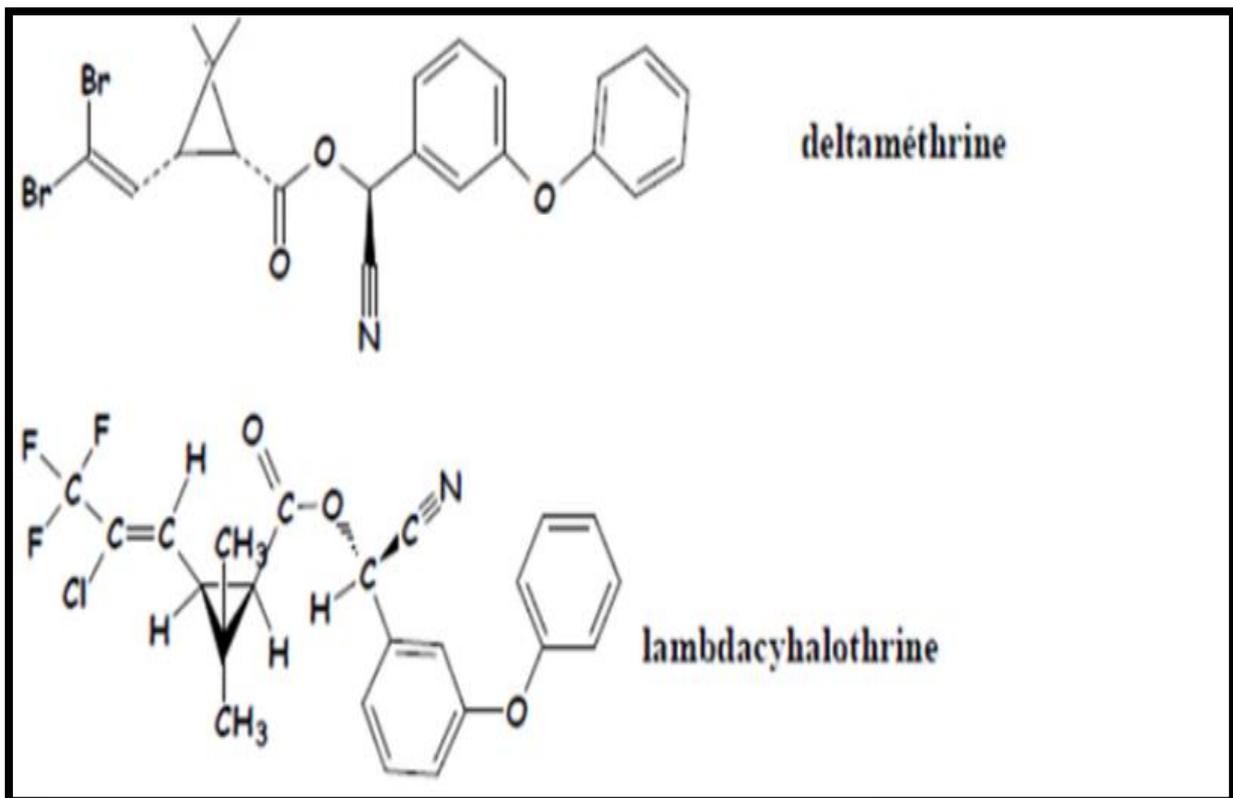


Figure 01 : Structure chimique et caractéristique de certains exemples de pyrethrinoides

### Classification des pyréthrinoides

- **Les pyr  thrinoides naturels**

Sont des insecticides d'origine végétale, extraits du pyrèthre produit par *Chrysanthemum cinerariaefolium*. Cette dernière est une plante herbacée, vivace, cultivée pour ses fleurs utilisées pour l'extraction d'une poudre insecticide contenant le pyrèthre, d'où l'appellation pyr  thrinoides. Ces composés sont instables, se dégradent rapidement et perdent leur pouvoir toxique à la suite d'un contact avec la lumière, l'air ou encore la chaleur. (Schleier et Peterson, 2012).

- **Les pyr  thrinoides synthétiques** : Sont divisés en deux Groupe :

**a. Les composés du type I** : dont la molécule ne contient pas le groupement  $\alpha$ -cyan   regroupent les composés suivants : alléthrine, bifenthrine, perméthrine, ph  nothrine, resm  thrine, sumithrine, t  fluthrine, tétraméthrine (Schleier et Peterson, 2012).

**b. Les composés du type II** : dont la molécule contient le groupement  $\alpha$ -cyan  , sont représentés par les composés suivants : cyfluthrine, cyhalothrine, cyperméthrine, deltaméthrine, fenval  rate, flum  thrine, fluvalinate, tralom  thrine. Les composés de type II sont plus toxiques que ceux du type I et ce en fonction de la durée de leur mode d'action (Schleier et Peterson, 2012).

#### 4.2.3.1. Lambda-cyhalothrine :

##### Propriétés

La lambda-cyhalothrine est un pyr  thrinoides de synthèse utilisé pour contrôler une large gamme de ravageurs à savoir les lépidoptères, les hémiptères, les diptères, et les coléoptères. 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). L'utilisation des pyr  thrinoides a augmenté en raison de la suspension des Organophosphorés contenus dans le chlorpyrifos ou le diazinon (Oros et Werner, 2005). Cette molécule est particulièrement utilisée dans la culture cotonnière béninoise afin de lutter contre les ravageurs du coton. Les pyr  thrinoides de synthèse ont fait l'objet d'étude de plusieurs chercheurs dont certains ont pu découvrir qu'ils sont de puissants insecticides à large spectre, respectueux de l'environnement, compatible en raison de leur persistance modérée, de leur faible volatilité et leur mobilité aqueuse pauvre dans le sol (Park, 1999).

**Tableau 2** : Principales propriétés de Lambda-cyhalothrine (**Agritox, 2011**).

Substance chimique	Lambda cyhalothrine
Numéro CAS	91465-08-6
Formule moléculaire	C <sub>23</sub> H <sub>19</sub> ClF <sub>3</sub> NO <sub>3</sub>
Code SMILES	CC1(C(C1C(OC(C2=CC(OC3=CC=CC=C3)=CC=C2)C#N)=O)/C=C(C(F)(F)F)\Cl)C

### Toxicité de la lambda-cyhalothrine

Comme les autres pyréthriinoïdes, la lambda-cyhalothrine est une molécule à potentiel toxique non seulement pour les insectes, mais aussi pour les mammifères (**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**).

#### 4.2.3.2. Deltaméthrine :

C'est un Pyréthriinoïdes de synthèse de type II, la deltaméthrine est très employée dans le secteur agricole et forestier et ce depuis qu'elle a prouvé son efficacité vis-à-vis de nombreux insectes. En outre, cette molécule est utilisée pour lutter contre le doryphore de la pomme de terre, la cicadelle, le ver-gris, la mineuse, la légionnaire bertha, l'altise, la fausse-teigne des crucifères, la sauterelle et la punaise grise. La deltaméthrine est aussi utilisée dans les programmes de contrôle de la malaria dans les pays concernés. Elle y est aussi utilisée pour imprégner les moustiquaires (**Yadav et al., 2001**).

**Tableau 3** : Principales propriétés physico-chimiques de la deltaméthrine (**Héla toumi, 2013**).

Nom	<b>Deltaméthrine</b>
Nom chimique	(1R,3R)-3-(2,2-dibromovinyl)-2,2-diméthyl-cyclopropane carboxylate de (S)- $\alpha$ -cyano-3-phénoxybenzyle
Formule chimique	C <sub>22</sub> H <sub>19</sub> Br <sub>2</sub> NO <sub>3</sub>
Type de pesticide	Insecticide et ecto-parasiticide

Groupe chimique	Pyréthroïde
Masse molaire (g/mole)	505,20
Point de fusion (°C)	90°C
Solubilité dans l'eau (mg L-1)	<0,0002 à 25°C
Point d'ébullition (°C)	se décompose à partir de 270 °C (avant le point d'ébullition)
Etat physique	Cristaux blancs*
Solubilité aqueuse (mg L-1)	<0,002 à 25°C*
Pression de vapeur (mm Hg)	9,3 10-11 (25°C)
Constante d'adsorption (Koc)	204 000 à 577 000
Coefficient de partage octanol-eau log Kow	6,20*
Constante de Henry (Pa m3 mol-1)	4,99 10-6 à 25°C*

### La toxicité du deltaméthrine

L'effet insecticide de deltaméthrine est associé à l'effet neurotoxique. L'organe cible est l'ensemble du système nerveux. La deltaméthrine est considérée comme étant beaucoup plus toxiques chez l'insecte que chez l'humain. Cette différence serait 2250 fois plus importante chez l'insecte, étant donné les différences inter-espèces dans la sensibilité des canaux sodium, de la différence de masse et de la différence de température corporelle. Les types d'effets indésirables chez l'humain sont principalement des effets immunitaires et endocriniens. Puisque les effets toxiques varient en fonction de la voie et de la dose d'exposition, les facteurs seront associés à des symptômes cliniques différents (**Bradberry et al., 2005**).

L'exposition aiguë à des doses plus élevées absorbées par ingestion peut entraîner des vomissements et diarrhées, une perte de conscience et une acidose métabolique ainsi qu'une sensation de brûlure dans la bouche. Une somnolence, de la fatigue, des palpitations et un trouble de la vision sont également possibles. Dans une étude de cas, des symptômes d'hyperactivité, des tremblements, des convulsions et une éventuelle paralysie ont aussi été rapportés suite à une intoxication orale aiguë (**Shukla et al., 2001**).

### 4.3. Classification selon l'utilisation :

Les centaines de pesticides agricoles chimiques peuvent être classés selon le type de ravageur ou de maladie qu'ils sont utilisés pour combattre (**Jeroen et al., 2004**).

**Tableau 4** : Produits chimiques agricoles y compris les pesticides et leur activité (**Jeroen et al., 2004**).

Catégorie	Activité
Algicide	Tue les algues, sur le bois par ex.
Anorexigène	Prévient que les animaux se nourrissent de la culture ou du produit stocké
Appât	Attire les animaux provoquant des fléaux
Bactéricide (P)	Tue ou inhibe la croissance des bactéries
Fongicide (P)	Désinfectant pour moisissures et champignons
Fumigant (P)	Gaz ou fumée contre les ravageurs ou les moisissures dans les produits stockés
Herbicide	Tue ou inhibe la croissance des mauvaises herbes
Régulateur de croissance d'insectes	Modifie les phases de développement ou de croissance des insectes
Insecticide (par ex. aphicide) (P)	Tue ou nuit aux insectes (par ex. aux pucerons)
Miticide / acaricide (P)	Tue ou nuit aux acariens (ou araignées)
Molluscicide	Tue les escargots et les limaces
Nématicide (P)	Tue les nématodes
Repousseur d'indésirables	Eloigne les animaux causant des fléaux
Rodenticide	Tue les rats, les souris, les rongeurs
Stérilisant	Stérilise les insectes par voie chimique
Termiticide (P)	Tue ou nuit aux termites

### 5. L'intérêt d'utilisation des pesticides :

Les pesticides sont utilisés depuis plus d'un siècle, et on peut naïvement penser qu'il existe quelques intérêts à leur usage. Pour s'en convaincre, il suffit de donner une liste de leurs diverses applications qui concernent, d'ailleurs une grande variété de domaines relatifs à plusieurs aspects des activités humaines. On peut assez commodément envisager trois groupes d'intérêts tout en observant que cette classification peut toujours être discutée bien qu'elle puisse être utile. On distinguera donc, la production des végétaux et de leurs produits, les aspects sanitaires liés aux organismes nuisibles et l'entretien des espaces non agricoles (**Calvet et al., 2005**).

## 6. Mode d'action des pesticides :

Le métabolisme des pesticides chez les animaux, les transformations de la substance active après absorption ont surtout lieu dans le foie. Parfois, elles conduisent à un produit qui est la véritable molécule active. Le plus souvent, des oxydases (enzymes) catalysent des réactions d'oxydation de la substance active ; les molécules que résultent de ces oxydations présentent des fonctions chimiques nouvelles : alcool, phénol, acide. Les métabolites réagissent avec de petites molécules libres (acide glucuronique, acétique, aspartique...) pour donner des conjugués, plus solubles dans l'eau que la substance active, et éliminés avec l'urine.

Chez les végétaux, les conjugués s'accumulent dans les vacuoles (Jean & Malausa, 2002).

## 7. Modes possibles d'expositions de l'homme aux 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 (CPP, 2002)

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 1 résume les possibles modes d'exposition de l'environnement et de l'homme aux pesticides. (Merhi., 2008 ; CPP, 2002).

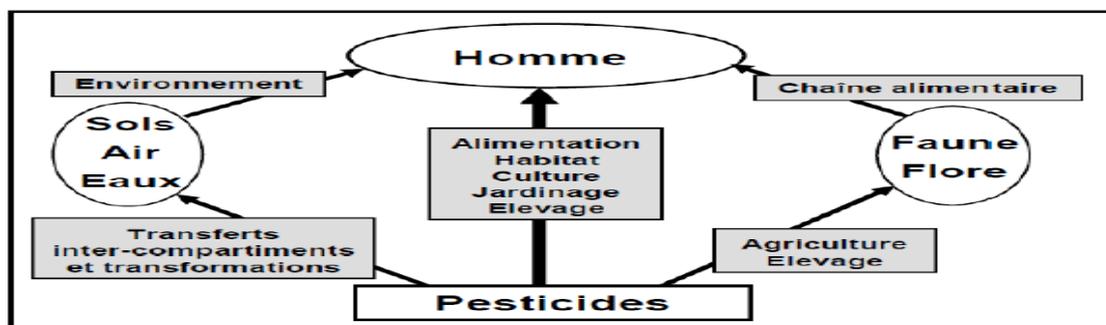


Figure02 : Modes d'exposition de l'homme et des milieux par les pesticides (Merhi., 2008).

### 7.1. Exposition professionnelle :

L'exposition professionnelle concerne essentiellement les personnes manipulant les produits, au moment de la préparation, de l'application et du nettoyage des appareils de traitement. Les agriculteurs constituent une population particulièrement exposée qui forme un groupe sentinelle pour l'observation d'éventuels effets des pesticides. L'exposition professionnelle aux pesticides des agriculteurs est très variable et complexe selon les exploitations agricoles (**Merhi, 2008**).

### 7.2. Exposition non professionnelle :

L'ensemble de la population peut être exposé aux pesticides lors des usages domestiques ou d'entretien des jardins mais surtout à des résidus de ces pesticides au travers de son environnement (eau, air, particules en suspension, poussières) et de son alimentation.

Les chiffres de l'OMS indiquent que la contamination des aliments par les pesticides est la voie d'exposition de loin la plus importante. Les évaluations de risque attribuent 90% de l'exposition à l'alimentation contre 10% à l'eau (**CPP, 2002**).

## 8. La toxicité des pesticides :

### 8.1. Les facteurs influençant la toxicité des pesticides :

- La dose.
- Les modalités de l'exposition.
- Le temps pendant lequel la personne est exposée.
- Le degré d'absorption.
- La nature des effets de la matière active et de ses métabolites.
- L'accumulation et la persistance du produit dans l'organisme.
- La sensibilité personnelle (antécédents, patrimoine génétique, etc.) (**Berrah, 2011**).

### 8.2. Les voies d'exposition aux pesticides :

Les pesticides peuvent être absorbés par les voies orales cutanées, et respiratoires, les cas d'intoxication les plus graves se produisent lorsque le produit est ingéré accidentellement, les enfants sont les plus souvent victimes de ce type d'intoxication car ils ont tendance à porter les objets et leurs doigts à la bouche. Mais les adultes qui fument et qui mangent sans s'être lavés les mains, après avoir manipulé les pesticides, peuvent être également affecté, chez les utilisateurs des pesticides, la voie cutanée constitue généralement la principale voie d'entrée des pesticides dans l'organisme.

On peut être exposés aux pesticides :

- Par la consommation d'eau au d'aliments contenant des résidus de pesticides.
- Par l'inhalation d'un air contaminé, en particulier à proximité (voire à distance, si la circulation atmosphérique pousse le nuage) d'un épandage aérien où l'exposition peut être très importante.
- En manipulant des pesticides pour le traitement des végétaux, au jardin ou à la maison.
- Les fœtus et les nouveau-nés peuvent être exposés à la plupart des pesticides à travers le placenta ou par le biais du lait maternel (**Berrah ,2011**).

### 8.3. Les effets des pesticides sur l'environnement :

Les pesticides ont largement contribué à l'augmentation de la production 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, 2). 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 5** : Les effets néfastes des pesticides sur l'environnement (**Sibieude et al., 1993**).

Pratiques agricoles	Sol	Eaux souterraines Et de surface	Flore et faune	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, mauvaise, épandage aérien, résidus

#### 8.4. Les effets des pesticides sur la santé :

Tous les pesticides sont potentiellement dangereux pour l'homme, la toxicité dépendant du mode de pénétration dans l'organisme. Dans la littérature scientifique, l'exposition de certains pesticides a été liée chez l'homme à des cancers associés à la suppression immunitaire, des réactions allergiques, des réponses auto-immunes, la suppression de la fonction immunitaire et une plus grande sensibilité aux agents pathogènes. **(Berrah ,2011)**

Une exposition importante aux pesticides peut provoquer 2 types d'intoxications :

- l'intoxication aiguë.
- l'intoxication chronique.

##### 8.4.1. Intoxication aiguë :

Généralement, l'intoxication aiguë se produit immédiatement ou peu après une exposition ponctuelle ou de courte durée à un pesticide. Une intoxication aiguë pourrait par exemple survenir chez de jeunes enfants qui ont eu accès à des pesticides mal entreposés. De même, des adultes pourraient s'intoxiquer parce qu'ils ont manipulé des pesticides sans prendre toutes les précautions nécessaires. La gravité d'une intoxication aiguë peut varier selon :

- La toxicité du pesticide.
- La quantité et la concentration de l'ingrédient actif dans le produit.
- La voie d'exposition. **(Berrah ,2011)**

##### Symptômes ou signes d'intoxication aiguë

Les symptômes ou signes les plus fréquents d'une intoxication aiguë aux pesticides sont les suivants :

- Maux de tête.
- Nausées.
- Vomissements. **(Berrah ,2011)**
- Etourdissements.
- Fatigue.
- Perte d'appétit.
- Irritation des yeux ou de la peau à l'endroit du contact avec le produit.

#### 8.4.2. Intoxication chronique :

Une personne peut aussi ressentir des effets toxiques après avoir été en contact avec de faibles doses de pesticides pendant des jours, des mois ou des années. La personne est alors victime d'une intoxication chronique. **(Berrah ,2011)**

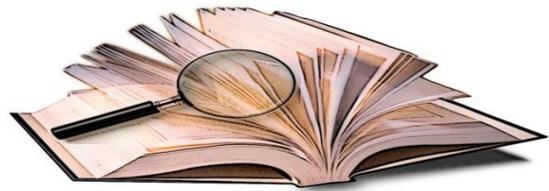
#### Symptômes ou signes d'intoxication chronique

Les principaux symptômes ou signes qui peuvent indiquer la présence d'une intoxication chronique sont les suivants :

- Fatigue.
- Maux de tête fréquents.
- Manque d'appétit.
- Perte de poids. **(Berrah ,2011)**

#### 9. Devenir d'un toxique dans l'organisme :

Une substance qui pénètre dans l'organisme peut avoir des effets bénéfiques (médicaments) ou néfastes (toxiques). Inversement, l'organisme peut agir sur cette substance : c'est le métabolisme. La réponse de l'organisme à un toxique dépend de la quantité de la substance présente dans un tissu ou un organe. Plusieurs facteurs interviennent dans les processus d'action toxique **(Baynes et Hodgson, 2010)**.



---

# *Chapitre 2*

*L'espèce végétale  
étudiée : le grenadier*

## 1. Généralités :

Le grenadier (*Punica granatum* L.), un gros buisson ou arbuste assez épineux, au feuillage caduc et de bel aspect, appartient à la famille des *Punicaceae*, division *Magnoliophyta*, classe *Magnoliopsida* et à l'ordre des *Myrtales*. Il est originaire de l'Asie subtropicale et s'est acclimaté à la région méditerranéenne (Sarkhosh et al., 2006).

### 1.1. Origine du nom :

La grenade était connue chez les romains sous l'appellation *Malunpunicum* par allusion à l'ancienne Phénicie et qui signifie pomme de Carthage, d'où est tiré l'actuel nom Latin «*Punica granatum*» (Goor, 1967; Hubbard et Clay, 1977).

Le terme grenade a fait son apparition dans la langue française en 1314. Il vient du Latin «*Malum granatum* » dont la signification est « fruit à petits grains » (Hubbard et Clay, 1977).

Elle porte aussi l'appellation *rimon*, *ruman*, *romanaetroma*, en Hébreux, Arabe, Espagnol et Portugais respectivement (Goor, 1967).

### 1.2. Répartition géographique :

Dans le monde la *Punica granatum* est surtout cultivée dans le bassin méditerranéen Espagne, Italie, Grèce, Algérie, Tunisie et Maroc...etc. De même en Amérique, on le rencontre déjà plus rarement dans le centre de la France, au Portugal, et en Bulgarie (Khedoudja et al., 2014).

En Algérie le grenadier est répandu dans toute l'Algérie et souvent sub-spontanée dans le Tell Algéro-constantinois. Floraison : Mai-Juin (Meftah, 2003 ; Beloued 2005).

## 2. Historique :

Depuis des milliers d'années, le grenadier "*Punica granatum*", ses fruits, son écorce et ses fleurs, sont utilisés, au Moyen-Orient et en Asie, régions dont cet arbuste est originaire, pour leurs propriétés médicinales (Gubernatis, 1882).

L'histoire de la grenade est liée au développement de l'humanité d'une manière impressionnante. La grenade a une place importante dans le Judaïsme, le Christianisme, l'islam, le Bouddhisme et le Zoroastrianisme (Lansky et Newman, 2007). Il est dit qu'elle avait 613 graines qui représentent les 613 commandements de la Torah, même si cela n'a pas été confirmé dans les temps modernes (Hebert, 2006).

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 (Calin Sanchez *et al.*, 2005).

### 3. Présentation et description botanique du grenadier :

Le grenadier est un arbuste de 2 à 5m très rameux. Feuilles opposées oblongues, entières et luisantes de 3à 7 sur 0.5 à 1.5cm. Fleur d'un rouge écarlate, grande 2 à 2.5cm de diamètre par 1 à 3 à l'aisselle des feuilles. Calice longuement campanulé coriace à tube soudé à l'ovaire et à 5à7 lobes persistants 5à7 pétales rouge brillant. Etamines très nombreuses. Fruit sub-globuleux de 2.5 à 4cm de diamètre, à graines nombreuses anguleuses, pulpeuses et acidulés (Beloued, 2005 ; Quezel et Santa, 1963). Son écorce est gris beige et à tendance à se crevasser et à desquamer avec l'âge (Quezel et Santa, 1963).

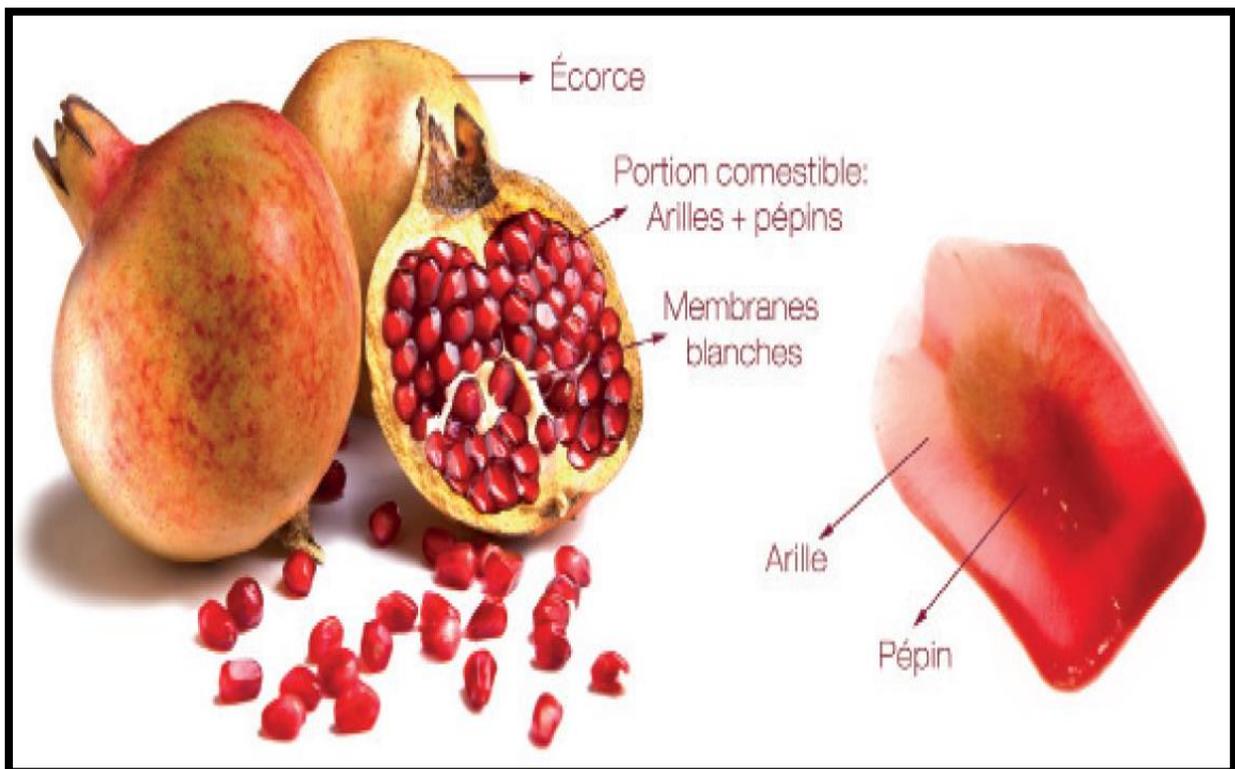


Figure03 : La grenade et ses différentes parties. (Calin Sanchez *et al.*, 2005).

#### 4. Grandier dans le règne végétal :

En botanique, il existe plusieurs systèmes de classification, la classification traditionnelle étant à distinguer de la classification APG (Angiosperm Phylo-genygroup).

*Punicag ranatum* n'appartient pas à la même famille selon le système de classification utilisé (Melgarejo et Martínez ,1992 ; Rana et al., 2010).

##### 4.1. Classification du *Punica granatum* :

###### 4.1.1 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:** *Punica granatum* (Melgarejo et Martínez ,1992 ; Rana et al., 2010).

###### 4.1.2. Classification APG II (2009) :

Il s'agit de la troisième version de la classification moléculaire et cladistique des Angiospermes, c'est-à-dire des plantes à graines, établi par l'*Angiosperms Phylogeny Group*, version revisitée de la classification APG de 1998 et APG II de 2003. Plus récente, cette classification réorganise le règne végétal en fonction des critères moléculaires, s'intéressant essentiellement à l'ADN de deux gènes chloroplastiques et un gène nucléaire du ribosome.

La classification APG III (2009) situe le grenadier comme suit :

**Clade:** Angiospermes

**Clade:** Dicotylédones vraies

**Clade:** Rosidées

**Ordre:** Myrtales

**Famille:** Lythraceae

**Genre:** *Punica*

**Espèce:** *Punica granatum*

## 5. Composition chimique des différents organes du grenadier :

### 5.1. L'écorce :

L'écorce du fruit contient deux importants acides hydroxy benzoïques, l'acide gallique et l'acide ellagique. Elle renferme également des acides hydroxy-cinnamiques, des dérivés de flavones, des molécules de coloration jaune et des anthocyanidines, responsables de la couleur rouge des grenades. De nombreux ellagitannins sont aussi présents, tels que la punicaline, la punicalagine, la granatine A et la granatine B (**Lansky *et al.*, 2007**).

### 5.2. Les feuilles :

Les feuilles du grenadier contiennent des flavones, telles que la lutéoline et l'apigénine. Cette dernière posséderait des propriétés anxiolytiques. Elles renferment également des tanins, comme la punicaline et la punicalagine (**Lansky, 2007**).

### 5.3. Les fleurs :

Les fleurs du grenadier contiennent de l'acide gallique et des triterpènes comme l'acide ursolique, acide oléanolique, acide asiatique, acide maslinique (**Lansky, 2007**).

### 5.4. Le fruit :

Le fruit possède dans ses différentes parties de nombreux composés chimiques d'une valeur biologique élevée : écorce, membranes blanches, arilles et pépins. (**Calin Sanchez *et al.*, 2005**).

## 6. Les différentes utilisations de la grenade :

### 6.1. Utilisation dans l'industrie agroalimentaire :

L'industrie agro-alimentaire et en particulier l'industrie des boissons s'intéressent de près à la grenade, avant tout pour son côté exotique et son goût nouveau. Le jus Pomegreat commercialisé depuis quelques années en Grande-Bretagne (mélange de grenade, aronie et autres fruits rouges) s'est ainsi imposé avant grâce à son goût agréable. (**kawaii *et al.*, 2004**)

### 6.2. Utilisation dans l'industrie cosmétique :

Les puissantes propriétés antioxydantes de la grenade en font un ingrédient de choix pour la cosmétique, en particulier dans les produits dermatologiques visant à protéger la peau du cancer. (**Afaq *et al.*, 2005**) ont en effet montré une action inhibitrice de l'extrait de grenade sur le cancer de la peau chez la souris. Par ailleurs, l'extrait de grenade est déjà incorporé dans

plusieurs lignes de produits cosmétiques qui exploitent son parfum, ses propriétés hydratantes et adoucissantes ainsi que ses effets raffermissant (crèmes anti-cellulite).

## 7. Propriétés thérapeutiques de grenade :

### 7.1. Protection contre la néphrotoxicité :

L'administration d'écorce de fruits a montré une amélioration notable des anomalies liées à la néphrotoxicité (**El-Habib, 2013**).

### 7.2. Activité antioxydant :

Des études *in vitro* ont démontré que le jus de grenade et les extraits de graines du grenadier ont 2 à 3 fois la capacité antioxydante du thé vert ou du vin rouge en piégeant les radicaux libres et en diminuant le stress oxydatif des macrophages et la peroxydation lipidique chez les animaux (**Basuet al., 2009**). Dans le jus de grenade les principaux polyphénols antioxydants sont les ellagitannins et les anthocyanines.

Les ellagitannins comptent pour 92 % de l'activité antioxydante du jus de grenade et sont concentrés dans l'écorce, les membranes et les moelles du fruit (**Seeram et al., 2004**).

### 7.3. Activité anti-inflammatoires :

Des études *in vivo* ont démontré que l'huile de graines pressées du grenadier inhibe la cyclo-oxygénase et la lipo-oxygénase. La cyclo-oxygénase, enzyme clé dans la conversion de l'acide arachidonique en prostaglandines (principaux médiateurs de l'inflammation), a été inhibée de 37% par l'extrait d'huile de graines pressées. La lipooxygénase, qui catalyse la conversion de l'acide arachidonique en leukotriènes, aussi médiateurs importants de l'inflammation, ont été inhibés de 75% par le même extrait (**Schubert, 1999**).

### 7.4. Activité anticancéreuse :

Des études *in vivo* utilisant des lignées cellulaires du cancer de la prostate ont démontré que divers extraits de grenadier (jus, huile de graine, écorce) inhibent potentiellement la prolifération et l'envahissement des cellules cancéreuses, causent une perturbation du cycle cellulaire, induisent l'apoptose et inhibent le développement de la tumeur (**Albrecht, 2004**). Le mécanisme anticarcinogénique du grenadier peut être expliqué par une modulation des protéines régulatrices de l'apoptose (**Malik, 2005**).

Une étude clinique en phase II portant sur 46 hommes ayant le cancer de prostate récurrent a illustré que 35% des patients montraient une diminution significative du taux sérique de PSA (Prostate Spécifique Antigène) durant le traitement avec du jus de grenade. La

même étude a indiqué que le grenadier pourrait affecter le cancer de prostate grâce à la combinaison de ses propriétés antiproliférative, apoptotique, antioxydante et anti-inflammatoire (**Pantuck, 2006**).

#### **7.5. Activité antidiabétique de *P. granatum* :**

Une étude pilote sur des patients diabétiques de type 2 avec hyperlipidémie a démontré que le jus concentré de grenade diminue l'absorption et augmente l'excrétion fécale du cholestérol et réduit significativement le taux total de cholestérol et du LDL cholestérol en améliorant les ratios total/HDL et LDL/HDL cholestérol. La consommation du jus de grenade réduit significativement le stress oxydatif chez les patients diabétiques (**Esmailzadeh et al., 2006**) sans affecter les paramètres diabétiques (**Rosenblat et al., 2006**).

#### **7.6. Activité antimicrobiennes de la grenade :**

L'écorce du fruit de *Punicagranatum* possède donc, *in vitro*, une activité antibactérienne. La combinaison unique des tanins et des alcaloïdes issus de cette écorce, ainsi que leur action synergique, explique probablement cette activité antibactérienne non retrouvée dans d'autres fruits également riches en tanins et alcaloïdes (**Prashanth, 2001**).

#### **7.7. Activité antiulcéreuse :**

L'écorce de grenade séchée en poudre présente un efficace traitement contre l'acidité d'estomac et l'ulcère d'estomac (**Championnière, 1850**). L'extrait de peau de grenade possède une activité inhibitrice des ulcères de l'estomac induits par l'aspirine et l'éthanol grâce à ses propriétés antioxydantes. Pour des doses de 250 et 500 mg/kg d'extrait hydroalcoolique de grenade (70% méthanol v/v), le pourcentage d'inhibition est respectivement de 22,37% et 74,21% pour les ulcères induits à l'aspirine et de 21,95% et 63,41% pour ceux induits par l'éthanol (**Ajaikumaretal., 2005**).

#### **7.8. Action cicatrisante de la grenade :**

Comparé à un produit topique antibactérien du commerce, une préparation à base d'extrait de peau de grenade (44% de composés phénoliques) à 5% permet une bonne cicatrisation, nettement visible par examen histo-pathologique des blessures des rats Wistar utilisés. Au bout de 10 jours, les rats traités au gel à l'extrait de peau de grenade sont guéris alors que 16 à 18 jours sont nécessaires à la cicatrisation des rats témoins (**Murphy, 2004**).

Les analyses par HPLC montrent que les composants majoritaires de l'extrait sont la catéchine et l'acide gallique, molécules qui pourraient donc avoir un intérêt dermatologique (**Murphy, 2004**).

### 7.9. Autres propriétés de grenade :

L'écorce, les racines de l'arbre, et parfois mêmes les écorces du fruit, sont utilisées contre les parasites intestinaux, en particulier le vers solitaire (ténia) et la dysenterie amibienne. Elles contiennent des alcaloïdes, dont la pelletiérine, vermifuge efficace contre le ténia, inscrite au Codex de pharmacopée française depuis 1937 (Cutray *et al.*, 2010).

### 8. Composés Phénoliques du Grandier :

#### 8.1. Composés phénoliques à faible poids moléculaire :

Les composés phénoliques peuvent être divisés en molécules simples, et en polymères de celles-ci ayant un poids moléculaire plus élevé. Parmi les premières il convient de citer les flavonoïdes, qui sont les composés les plus importants de ce sous-groupe ; tandis que les anthocyanosides sont les composés les plus représentatifs, responsables de la couleur caractéristique de la grenade. Parmi les composés phénoliques à faible poids moléculaire il faut mettre l'accent sur les acides phénoliques, et parmi ces derniers sur l'acide gallique et l'acide ellagique (Figure 04). (Ángel, 2010).

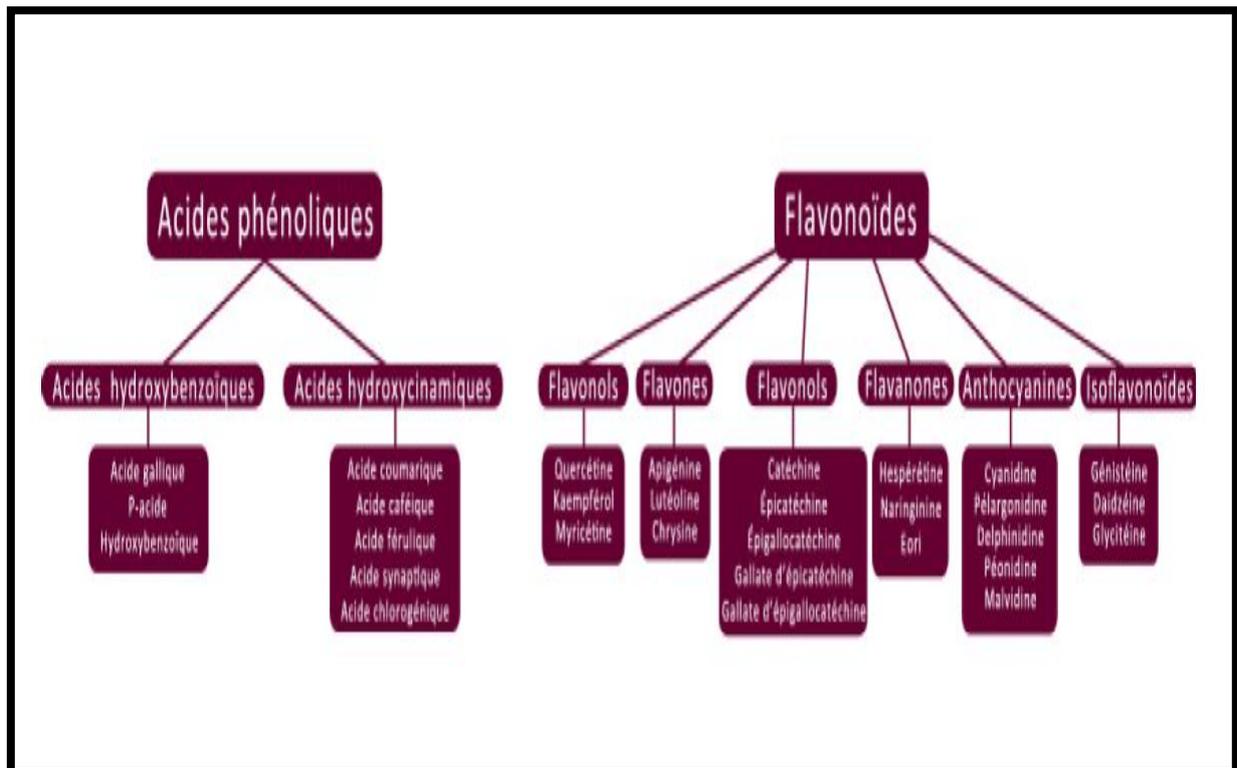
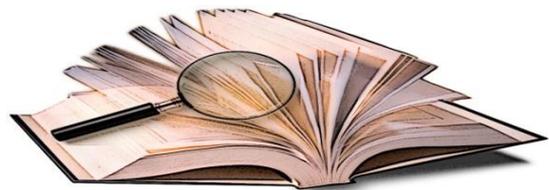


Figure 04 : Composés phénoliques à faible poids moléculaire de grenadier (Ángel, 2010).

**8.2. Composés phénoliques à poids moléculaire élevé :**

Les tanins sont les polyphénols à poids moléculaire élevé les plus caractéristiques. L'écorce de la grenade est riche en tanins hydrolysables, principalement en punicaline, pédunculagine et punicalagine (*Ángel, 2010*).



---

*Chapitre 3*  
*Stress*  
*oxydatif*

## 1. Généralité sur Stress oxydatif :

Il s'agit d'une agression chimique oxydative de notre organisme. Il se définit comme un déséquilibre de l'apport oxydant/antioxydant quand les oxydant augmente ce phénomène entraîne e dommage cellulaire importante (**atamer et al., 2008**)

Le stress oxydatif, appelé aussi stress oxydant, se définit comme étant un déséquilibre entre la génération d'espèces oxydant activées (EOA) et les défenses antioxydants de l'organisme en faveur des premiers, ce qui conduit à des dommages cellulaires irréversibles (**Haleng et al., 2007 ; Thomas et al., 2003**). Le stress oxydatif devient anormal lorsque les cellules sont soit dépassées par la quantité de radicaux libres à éliminer, soit ne disposent pas de ressources antioxydantes suffisantes pour les éliminer (**Pincemail et al., 2008**).

## 2. Définition des radicaux libres :

Un radical libre est une espèce chimique, molécule, partie de molécule ou simple atome, capable d'avoir une existence indépendante (libre) en contenant un ou plusieurs électrons célibataires. Cela lui confère une grande réactivité (**Goudable et Favier, 1997**).

En effet, ce radical libre aura toujours tendance à remplir son orbitale en captant un électron pour devenir plus stable : il va donc se réduire en oxydant un autre composé (**Halliwell, 1999**).

## 3. Origine des radicaux libres :

Il existe deux origines possibles : endogène et exogène.

### 3.1. Origine endogène :

Les précurseurs des ROS, l'anion superoxyde  $O_2^{\cdot -}$  peut provenir de plusieurs sources cellulaires. Il est formé après réduction de l'oxygène  $O_2$  par un électron et en présence d'un cofacteur. Cet anion est très instable et peut traverser la membrane plasmique (**Belkheiri, 2010**). Les différents enzymes permettent cette réaction sont : la NADPH oxydase, la xanthine oxydase, les cyclo-oxygénases ou COX, les lipo-oxygénases, les enzymes du réticulum endoplasmique lisse (cytochrome P450) et celles de la chaîne de transport des électrons dans la mitochondrie (**Fusco, 2007**), l'oxygène est réduit à 95 % dans les mitochondries (centrale énergétique de la cellule) par voie enzymatique en molécule non toxique comme  $H_2O$  (**Belkheiri, 2010**). Il y a également d'autres sources cellulaires des radicaux libres telles que l'enzyme xanthine oxydase joue un rôle important dans la production des ERO (particulièrement  $O_2$ .et  $H_2O_2$ ) (**Belkheiri, 2010**).

### 3.2. Origine exogène :

L'organisme humain est soumis à l'agression de différents agents extérieurs capables de donner naissance à des ERO (**Favier, 2003**) : les rayonnements UV, l'oxyde d'azote (NO) et le dioxyde d'azote (NO<sub>2</sub>) présents dans notre environnement (goudron, tabac...etc), l'ingestion d'alcool, certains médicaments anticancéreux et antibiotiques sont responsables de la synthèse de radicaux libres (**Favier, 2003 ; Mohammedi, 2005**).

### 4. Type de radicaux libre :

Les formes de l'oxygène provoquent le stress oxydant sont : l'oxygène singulier et O<sub>2</sub>, le peroxyde d'hydrogène H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, les peroxydealkyles ROOH, le radical super oxyde O<sub>2</sub>, les radicaux hydroxyles OH, peroxyde ROO et alkyles RO. (**Muanda, 2010**). Ils peuvent être dérivés de l'oxygène (espèces réactives de l'oxygène ERO) ou d'autres atomes comme l'azote (espèces réactives de l'azote ERA). La présence d'un électron célibataire confère aux radicaux libres une grande réactivité (demi-vie courte) et ils peuvent être aussi bien des espèces oxydantes que réductrices. (**Guenz et, 2012**).

### 5. Conséquences du stress oxydant :

#### 5.1 Peroxydation lipidique :

La Peroxydation lipidique est un phénomène général qui se produit dès la présence de l'oxygène. Huiles de (poissons, graisse animales, membranes cellulaires, lipoprotéines) sont concernés. L'étude des mécanismes de la Peroxydation lipidique et des moyens de la prévenir par les antioxydants connaît depuis les dernières décennies un regain d'intérêt du aux implications de ces phénomènes dans les domaines de la nutrition et de la santé (**Josiane et Pierre, 2006**).

#### 5.2 Oxydation des protéines :

Les acides aminés possèdent des susceptibilités différentes vis-à-vis des EOA. Les plus réactifs sont l'histidine, la proline, le tryptophane, la cystéine et la tyrosine. Toute attaque radicalaire d'un acide aminé provoquera l'oxydation de certains résidus avec, pour conséquences, l'apparition de groupements carbonylés, des clivages de chaînes peptidiques et des ponts bi-tyrosine intra- et inter-chaînes. La plupart des dommages sont irréparables et peuvent entraîner des modifications fonctionnelles importantes (non- reconnaissance d'un récepteur par un ligand, perte d'activité enzymatique). Certaines protéines oxydées sont peu dégradées et forment des agrégats qui s'accumulent dans les cellules et dans le compartiment extracellulaire (**Haleng et al., 2006**).

### 5.3 Oxydation des lipoprotéines :

Le dommage oxydatif provoque des changements dans la structure des lipoprotéines de faible densité (low density lipoproteins ou LDL) (**Gardes-Albert, 2004**). L'oxydation des LDL est l'un des processus de modification des LDL, avec la glycation ou l'agrégation par exemple, permettant leur fixation au niveau intra pariétal vasculaire, et finalement leur action toxique vis-à-vis des cellules environnantes (**Beaudeux *et al.*, 2006**).

### 5.4 Oxydation des glucides :

Les cibles glucidiques sont essentiellement le glucose et les protéoglycanes du cartilage. L'oxydation au sens large du glucose est aussi appelée « glycosoxydation » et regroupe en fait 2 mécanismes possibles (**Halliwell et Gutteridge, 2007**) :

Soit oxydation au sens strict du glucose, donnant des dérivés carbonyles susceptibles de réagir avec une protéine, pour aboutir à la formation de « produits finaux de glycosylation » ou PFG.

Soit formation d'une liaison covalente entre un ose et les groupements aminés libres d'une protéine : on parle de « glycosylation non-enzymatique des protéines ». Cela forme une protéine glyquée, qui peut être attaquée par des ERO telles que HO• ou NO<sub>3</sub><sup>-</sup> pour former des PFG.

## 6. Les défenses antioxydants :

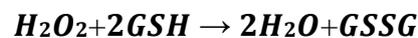
Pour se protéger des effets délétères des EOA, l'organisme dispose d'un ensemble complexe de défenses antioxydants. On distingue deux sources d'antioxydants : l'une est apportée par l'alimentation sous forme de fruits et légumes riches en vitamines C, E, caroténoïdes, ubiquinone, flavonoïdes, glutathion ou acide lipoïque ; l'autre est endogène et se compose d'enzymes (super-oxyde-dismutase, glutathion peroxydase, catalase), de protéines (ferritine, transferrine, céruléoplasmine, albumine) et de systèmes de réparation des dommages oxydatifs comme les endonucléases. A cela s'ajoutent quelques oligoéléments comme le sélénium, le cuivre et le zinc qui sont des cofacteurs d'enzymes antioxydants (**Haleng *et al.*, 2006**).

### 6.1. Système antioxydant enzymatique :

Les systèmes de défense contre le stress oxydatif ont pour rôle d'inhiber l'oxydation d'un substrat. Les antioxydants primaire, qui sont pour la plupart des enzymes vont limiter la production des espèces réactives de l'oxygène (ERO) et les antioxydants secondaires qui peuvent être des substances lipo-ou hydrosolubles vont piéger les ERO sous une forme peu réactive (**Zieliniski et Portner, 2000**).

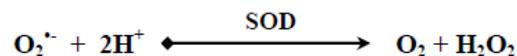
### 6.1.1. Les glutathion peroxydases

La GPx est une sélénoprotéine (cinq isoformes) qui réduit les peroxydes aux dépens de son substrat spécifique, le glutathion réduit (GSH). Son rôle principal consiste en l'élimination des peroxydes lipidiques résultant de l'action du stress oxydant sur les acides gras polyinsaturés. La GPx est effondrée en cas de déficit majeur en sélénium, elle est donc un bon reflet de cette carence. Toutefois, pour un apport adéquat en sélénium, les teneurs en GPx atteignent un plateau. Le dosage en GPx ne peut donc être utilisé comme marqueur d'une intoxication en sélénium. Cependant, sa synthèse étant rénale et hépatique, d'autres facteurs tels que l'insuffisance rénale ou la cytolysse hépatique peuvent modifier sa concentration (Haleng *et al.*, 2006).



### 6.1.2. Les super-oxydes-dismutases (SOD) :

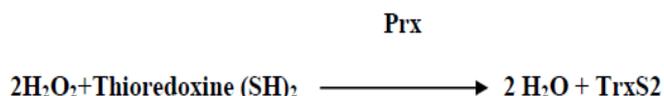
Les super-oxydes-dismutases (SOD) (EC 1.15.1.1) sont des métallo-enzymes ubiquitaires qui catalysent la dismutation des ions superoxydes en peroxydes d'hydrogènes et oxygènes moléculaires (Comhair et Erzurum, 2002) selon la réaction suivante :



Ces enzymes accélèrent la vitesse de cette réaction spontanée rendant très rapide la disparition du superoxyde mais en générant le peroxyde d'hydrogène (Zelko *et al.*, 2002).

### 6.1.3. Peroxy redoxine (Prx) :

Les peroxy redoxines (Prx) constituent une autre famille de peroxydases constituée de six membres, dont cinq (Prx I-V) possèdent deux sites catalytiques à base de cystéines. Ces peroxydases réduisent un grand nombre de molécules comme l' $H_2O_2$  et utilisent la thioredoxine (Trx) comme réducteur. Ces enzymes réduisent également les petites alkyl hydroperoxydes, le peroxyde nitrite et les hydroperoxydes dérivés de phospholipides ou d'acides gras. Leurs rôles physiologiques incluent à la fois des fonctions dans la lutte antioxydante et dans la signalisation intracellulaire (Rhee, 2005).

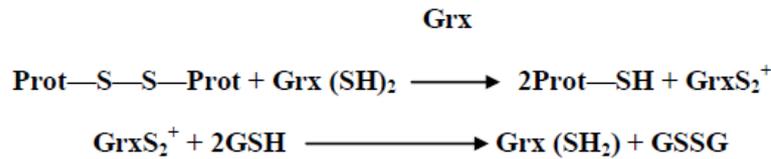


### 6.1.4. Glutaredoxine :

Les glutaredoxines (Grx) sont aussi des dithiols  $[(SH)_2]$ -disulfure des oxydoréductases dont les fonctions catalytiques requièrent la présence de GSH. Elles catalysent la réduction

des protéines disulfures en leurs formes sulfhydryl respectives. La forme oxydée de la Grx est alors réduite de nouveau grâce aux équivalents réduits du GSH.

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

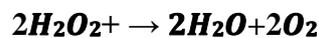


## 6.2. Système antioxydant non enzymatique :

Etant liposolubles, ils se répartissent au sein des membranes cellulaires et des lipoprotéines plasmatiques circulantes. On trouve dans cette catégorie : la vitamine E, les caroténoïdes et l'ubiquinol.

### 6.2. 1. La catalase (CAT) :

La catalase se trouve dans les peroxysomes essentiellement. Elle assure la transformation en eau et dioxygène du peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$ , pour lequel elle a une moins forte affinité que la GPX. Cette enzyme est abondante dans le foie et les globules rouges. Elle se retrouve préférentiellement dans les peroxysomes et en plus faible quantité dans le cytosol (Powers et Jackson, 2008).



### 6.2.2 Polyphénols :

Les polyphénols végétaux regroupent une grande variété de composés comprenant entre autres les flavonoïdes, les anthocyanes et les tanins. Ce sont des composés ubiquistes que l'on retrouve dans les plantes. Ils attirent l'attention depuis quelques années à cause de leurs propriétés antioxydantes. En effet, ils sont capables de piéger des radicaux libres, d'inhiber la peroxydation lipidique en réduisant les radicaux hydroxyles, superoxydes et peroxydes. Ils sont aussi capables de piéger les ions métalliques, car ils ont des propriétés chélatrices (Delattre *et al.*, 2005).

### 6.2.3. Les caroténoïdes :

Ils sont majoritairement représentés par le  $\beta$ -carotène, appelé aussi « provitamine A ». Du fait de leur faible concentration, mais complémentaires des systèmes principaux évoqués plus haut. Le  $\beta$ -carotène désactive l'oxygène singulet et  $O_2$ , et piège les radicaux peroxydes  $ROO^\circ$  (Krinsky, 1989).

#### 6.2.4. L'ubiquinol (Coenzyme Q10) :

Le coenzyme Q10 est un transporteur d'électrons présent dans la chaîne oxydative mitochondriale, dans les membranes cellulaires, dans le plasma et dans les lipoprotéines. Il est capable de donner des électrons et permet à ce titre une protection des membranes contre la lipo-péroxydation (Powers et Jackson, 2008).

#### 6.2.5. Glutathion :

Le glutathion (GSH sous sa forme réduite) est un tri-peptide formé par la condensation d'acide glutamique, de cystéine et de glycine (Haleng et al., 2007). Le glutathion peut interagir directement avec les espèces oxygénées activées mais il est principalement utilisé comme substrat de la glutathion peroxydase qui assure l'élimination des lipides peroxydés (Jones, 2002).

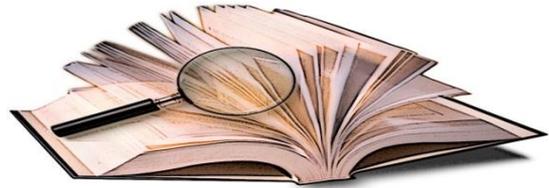
#### 6.2.6. La vitamine C :

La vitamine C ou acide L- ascorbique est une molécule soluble dans l'eau. Elle est synthétisée par les plantes et la plupart des animaux, excepté chez certains mammifères tels que l'homme. La vitamine C est, avant tout, un excellent piègeur des ERO ( $\text{HO}\cdot$  ou  $\text{O}_2\cdot^-$ ). Elle inhibe également la peroxydation lipidique en régénérant la vitamine E à partir de la forme radicalaire issue de sa réaction avec des radicaux lipidiques et les dommages aux protéines et à l'ADN

La vitamine C a également un pouvoir antioxydant indirect en recyclant les caroténoïdes et la vitamine E. D'un autre côté, la vitamine C permet le recyclage de  $\text{Fe}^{3+}$  en  $\text{Fe}^{2+}$  favorisant ainsi la réaction de Fenton et a donc de manière indirecte une action pro-oxydante (Kinsky, 1989 ;Bors et al., 1990).

#### 6.2.7. Vitamine E :

La vitamine E est un terme générique pour tous les tocophérols et les tocotriénols, des quels existent dérivatifs et dont l'alfa-tocophérol est le plus abondant. La vitamine E est liposoluble et le principal antioxydant dans les membranes des cellules, en particulier celles des mitochondries (Traber et al., 2007). Sa structure moléculaire comporte une extrémité hydrophile, correspondant au noyau chromanol et une extrémité hydrophobe (chaîne phytyle), il joue un rôle important dans la suppression de la peroxydation des lipides. Il neutralise les radicaux peroxyde (Lecerf et al., 1994).



---

# *Chapitre 4*

*Les*

*polyphénols*

## 1. Généralités sur Les polyphénols :

Les composés phénoliques appartiennent à la classe des métabolites secondaires des végétaux. Ils interviennent dans la défense des plantes contre les agressions environnementales. En effet, de nombreuses fonctions peuvent être attribuées à ses molécules, ils peuvent résister aux diverses agressions des organismes pathogènes, ils participent de manière très efficace à la tolérance des végétaux aux divers stress et jouent le rôle des signaux de reconnaissance entre les plantes (Allélopathie) et entre les plantes et les symbioses (Macheix et al., 2005).

L'appellation « polyphénols » ou « composés phénoliques » regroupe un vaste ensemble de plus de 8 000 molécules, présentant toutes un point commun : la présence dans leur structure d'au moins un cycle aromatique à 6 carbones, lui-même porteur d'un nombre variable de fonctions hydroxyles libres ou engagées dans une autre fonction : éther, ester, hétéroside (OH) (Hennebelle, 2004 ; Edeas, 2007).

## 2. Structures chimiques et classification :

La structure chimique est identique à tous les polyphénols : un ou plusieurs noyaux aromatiques hydroxylés. La structure de ces composés varie, des molécules simples (acides phénoliques simples) aux molécules hautement polymérisées (tanins condensés). Les polyphénols sont classés en différents groupes en fonction du nombre de noyaux aromatiques qui les composent et des éléments qui les relie. On distingue les phénols simples (parmi eux les acides phénoliques), les flavonoïdes, les lignanes, les stilbènes et coumarines (Boros, 2010).

Ils peuvent être classés en fonction du nombre et de l'agencement de leurs atomes de carbone (Tableau. 05).

**Tableau 5 :** Principaux composés phénoliques du grenadier

Squelette	Classification	Exemple
C6-C1	Acides phénols	Acide gallique
C6-C2	Acétophénone	Gallacetophénone
C6-C2	Acide Phénylacétique	Acide - hydroxyphénylacétique
C6-C3	Acides Hydroxycinamiques	Acide - coumarique
C6-C3	Coumarines	Esculitine

C6-C4	Naphthoquinones	Juglone
C6-C1-C6	Xanthones	Mangiferine
C6-C2-C6	Stilbènes	Resveratrol
C6-C3-C6	Flavonoïdes	Naringénine

Une classification de ces substances a été proposée par HARBORNE en 1980. On peut distinguer les différentes classes des poly-phénols en se basant d'une part, sur le nombre d'atomes constitutifs et d'autre part, sur la structure de squelette de base (**Reddy et al, 2003**).

**Les acides phénoliques** (acides hydroxy-benzoïques, acides hydroxy-cinnamiques), Ces composés sont universellement rencontrés chez les plantes (**Reddy et al, 2003**).

**Les flavonoïdes** : Le terme flavonoïdes désigne une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des poly-phénols. Certains sont des pigments quasi-universels des végétaux. Les flavonoïdes se répartissent en plusieurs classes des molécules dont les plus importants sont les flavones, les flavonols, les dihydroflavanols, les isoflavanones, les chalcones, les tannins, les anthocyanes, les aurones et les anthocyanes (**Reddy et al, 2003**).

### 3. Biosynthèse :

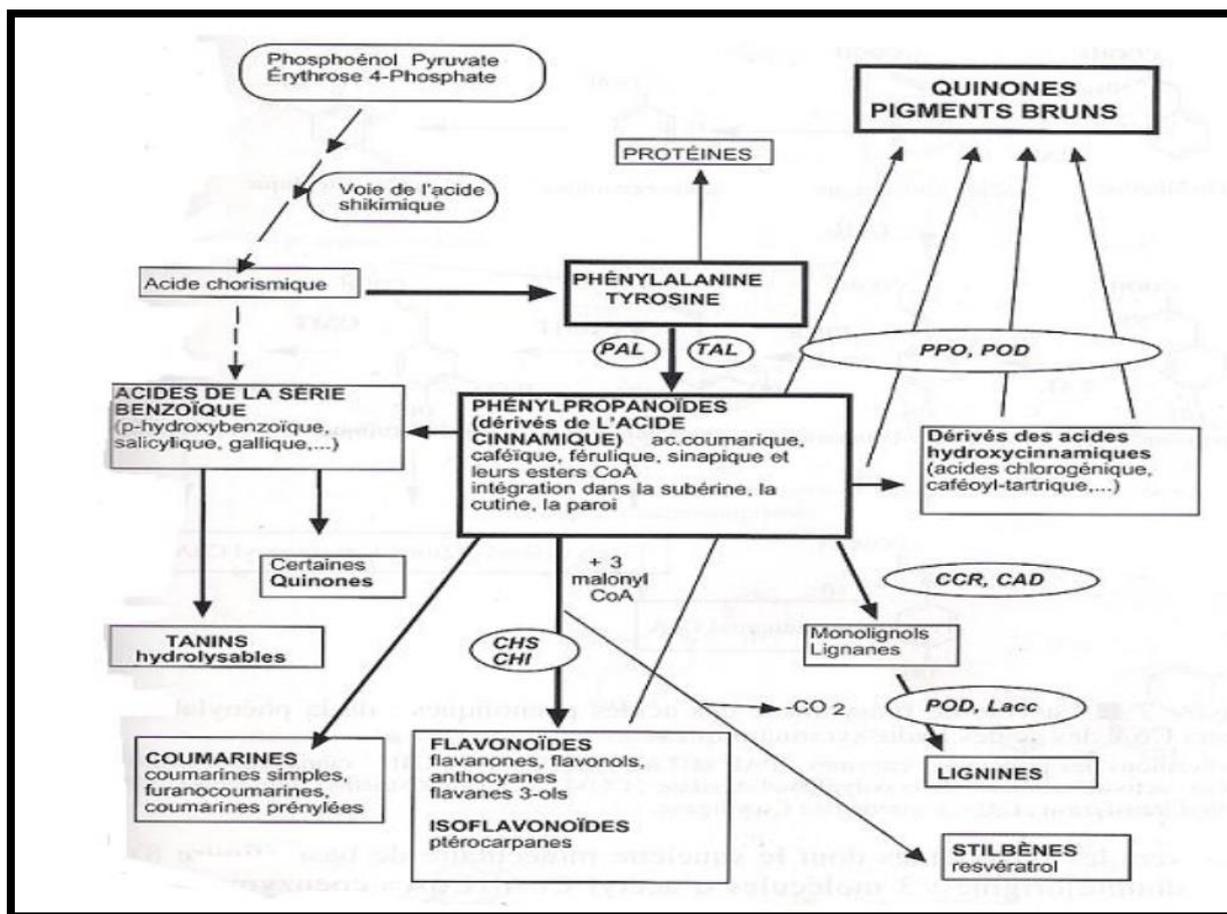
Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires et sont synthétisés, par des plantes au cours de leur développement normal, en réponse à des infections, des blessures, des rayons ultra-violet (UV) et des insectes. Ces composés phytochimiques provenant de la phénylalanine et la tyrosine sont ubiquitaires dans les plantes (**Pereira et al., 2012**)

Les polyphénols sont synthétisés à partir de deux voies biosynthétiques :

Celle de l'acide shikimique, qui conduit après transamination et désamination, aux acides cinnamiques et à leurs nombreux dérivés tels que les acides benzoïques ou les phénols simples.

Celle issue de l'acétate/malonate, qui conduit à des polys  $\beta$ -coesters (poly-acétates) de longueur variable menant par cyclisation à des composés polycycliques tels que les dihydroxy 1,8-anthraquinone ou les naphthoquinones.

De plus, la diversité structurale des composés polyphénoliques, due à cette double origine biosynthétique est encore accrue par la possibilité d'une participation simultanée de deux voies dans l'élaboration de composés d'origine mixte, « les flavonoïdes » (**Martin S., Andrantsitohaina R., 2002**).



**Figure 05 :** Les grandes lignes de la biosynthèse des principaux groupes de composés phénoliques (Macheix et al., 2006)

Abréviation des principales enzymes : **PAL** : phénylalanine ammonialyase ; **TAL** : tyrosine ammonialyase ; **CCR** : cinnamateCoA réductase ; **CAD** : cinnamyl alcool déshydrogénase ; **CHS** : chalcone synthase ; **CHI** : chalconeflavanone isomérase ; **PPO** : polyphénoloxydases ; **Lacc**: laccases

#### 4. Rôle des polyphénols dans les plantes :

Une des fonctions majeures des flavonoïdes est de contribuer à la couleur des plantes notamment à celle des fleurs. Or, c'est par la couleur de ses fleurs que la plante exerce un effet attracteur sur les insectes et les oiseaux pollinisateurs, assurant par ce biais une étape fondamentale de sa reproduction. On peut également noter que les flavonoïdes, en repoussant certains insectes par leur goût désagréable, peuvent jouer un rôle dans la protection des plantes.

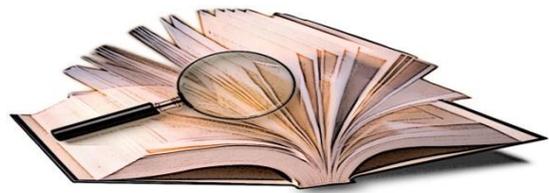
Les flavonoïdes montrent d'autres fonctions intéressantes dans le contrôle de la croissance et du développement des plantes en interagissant d'une manière complexe avec les diverses hormones végétales de croissance. Certains d'entre eux jouent également un rôle de phytoalexines, c'est-à-dire de métabolites que la plante synthétise en grande quantité pour

lutter contre une infection causée par des champignons ou par des bactéries. D'autre part, les composés phénoliques possèdent souvent une activité antimicrobienne. (Boskou, 2006) Ainsi, il a été montré que les catéchines des feuilles du thé inhibent la croissance de micro-organismes en altérant des fonctions membranaires des pathogènes, les détruisant à plus ou moins long terme (Agric, 2009).

### 5. Les polyphénols comme antioxydants :

Les principaux mécanismes d'activité antioxydante sont (Halliwell, 1994) :

- Le piégeage direct des EOR ;
- L'inhibition des enzymes impliquées dans le stress oxydant et la chélation des traces métalliques responsables de la production des EOR;
- La protection des systèmes de défense antioxydants.
- Les polyphénols peuvent agir selon ces divers mécanismes.



---

# *Chapitre 5*

*Le rein et la*

*fonction rénale*

## 1. Définition :

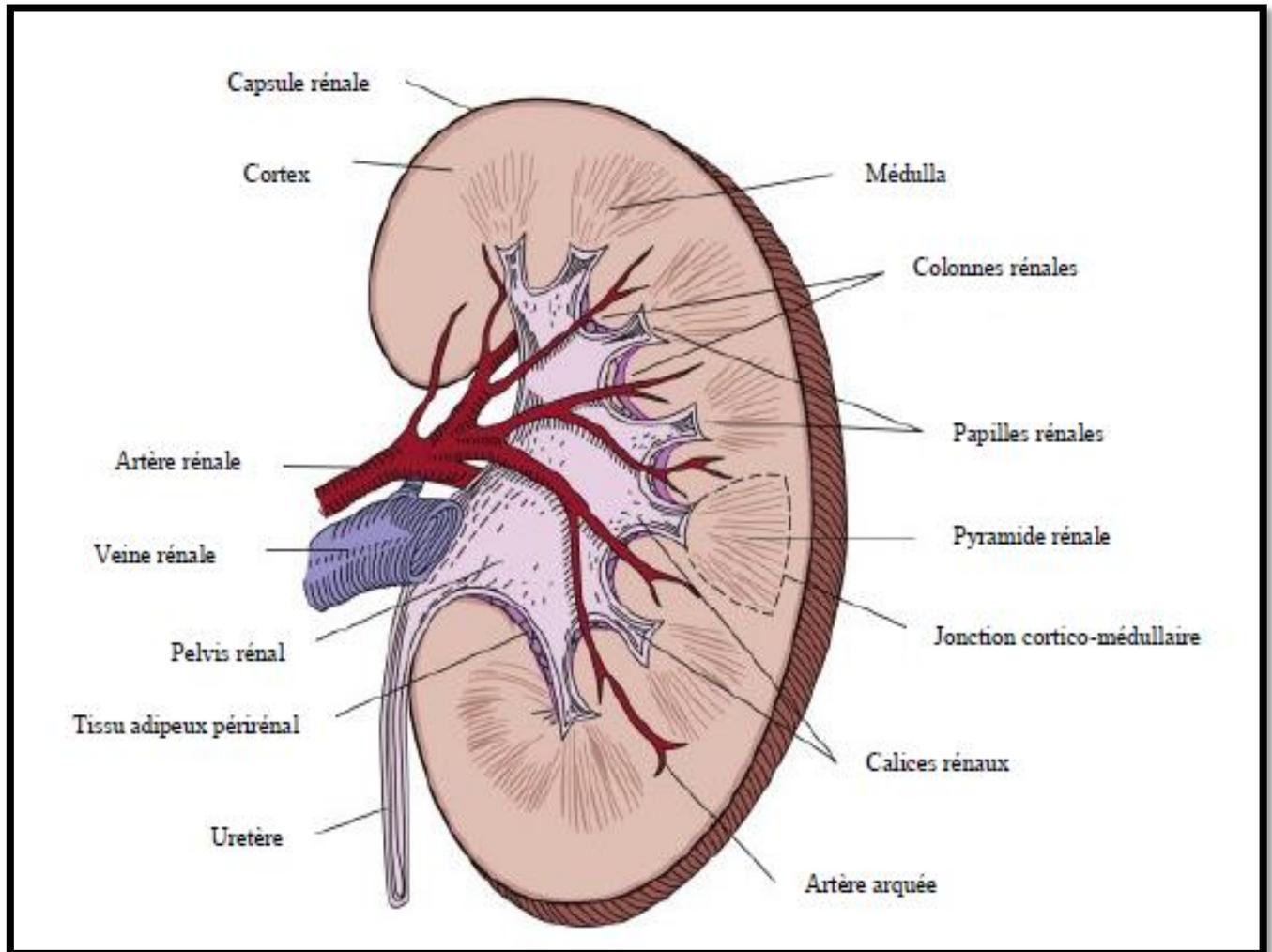
Le rein est un organe vital, tout comme le cœur et les poumons. Il est souvent l'organe cible chez les animaux d'expérience (**Rhiouani et al., 2008**), le rein est un organe important dans le cheminement des substances toxiques. Sa fonction majeure consiste à filtrer le sang, en dégageant toute substance nocive et en conservant les molécules essentielles (**Reichl, 2004**)

Les reins sont des machines à épurer très sophistiquées capables de filtrer jusqu'à 170 litres de sang par jour. En filtrant le sang, ils produisent l'urine.

Outre la filtration du sang et la production d'urine, les reins remplissent également d'autres fonctions physiologiques importantes comme le maintien de la teneur en eau et en sel du corps à un niveau d'équilibre (**Brenner and Rector 2008**).

## 2. Morphologie et Anatomie:

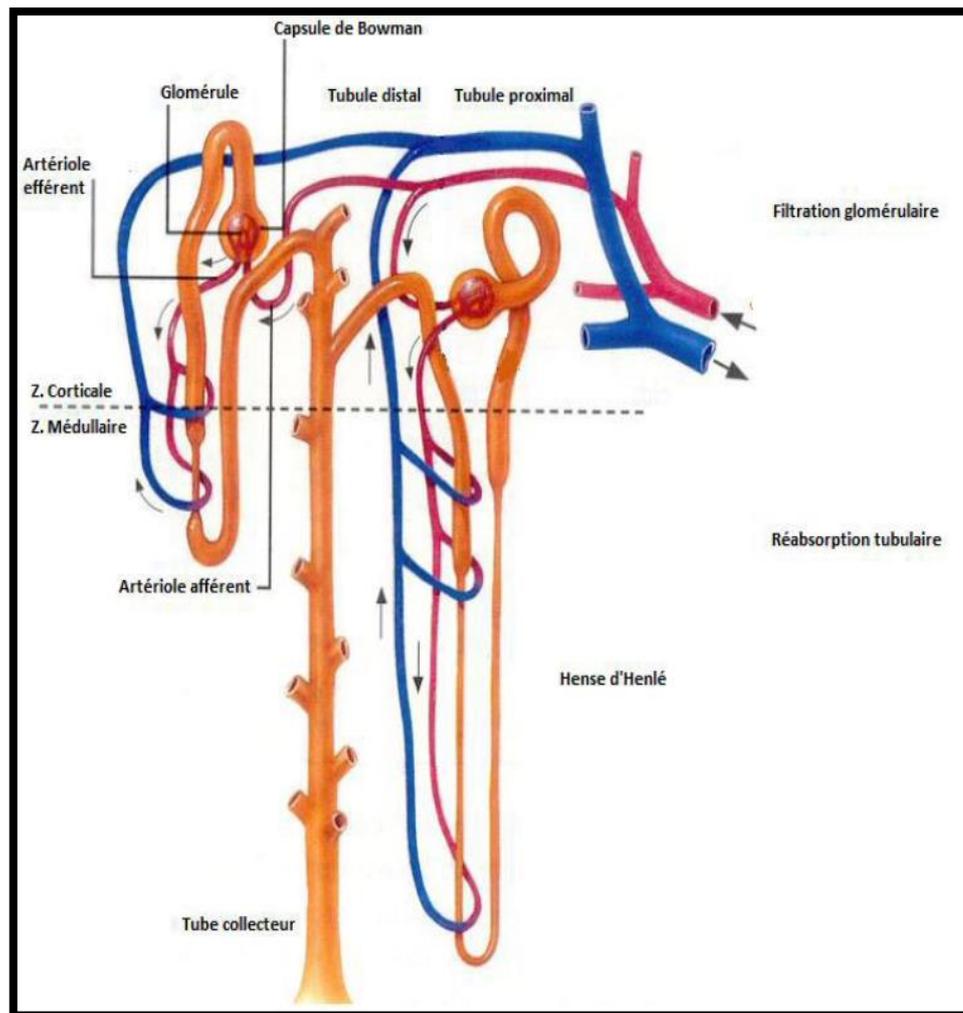
Le rein est un organe présent en paire. Sa structure se divise en trois parties : le cortex, la médulla et le bassinet. Le cortex est la partie extérieure recouvrant la médulla. Chez l'humain, la médulla se compose de 8 à 18 pyramides rénales et forme la majeure partie des tubules rénaux (**Brenner and Rector 2008**). Chez le souri, il y a présence d'une seule pyramide rénale. Le bassinet rénal est l'allongement de l'uretère qui se rend dans le rein ; cette partie reçoit l'urine des calices adjacents aux pyramides rénales. Le rein reçoit le flot sanguin via l'artère rénale qui se divisera en petites ramifications, artérioles et capillaires. Le sang veineux ressort du rein par la veine rénale. Le point de rencontre de l'uretère et des vaisseaux sanguins au rein se nomme le hile rénal (Figure06). Le rein est innervé par le plexus rénal découlant des nerfs splanchiques lombaires. L'unité fonctionnelle du rein est le néphron, composé du corpuscule rénal et de segments tubulaires. En moyenne, l'humain possède 1 million de néphrons tandis que le souri en a 30,000. Lorsque le néphron s'enfonce profondément dans la médulla, il est caractérisé comme juxtamédullaire. S'il effleure la médulla, sans y pénétrer, il est superficiel (**Johnson and Byrne 2003**)



**Figure 06 : Anatomie interne du rein. (Adapté de Brenner and Rector 2008)**

### **3. Unité structurale du rein ; le néphron :**

Microscopiquement (Figure 07), chaque rein est constitué d'un complexe des unités Fonctionnelles appelées néphrons (**Lacarelle et Viala, 2005**). Ceux-ci sont composés des glomérules (petits réseaux de vaisseaux sanguins) et des tubules (subdivisé en tubule proximal, l'anse d'Henlé, le tubule distal) et finalement le tube collecteur.



**Figure 07 :** Organisation structurale du néphron rénal (Tarloff et Wallace, 2010).

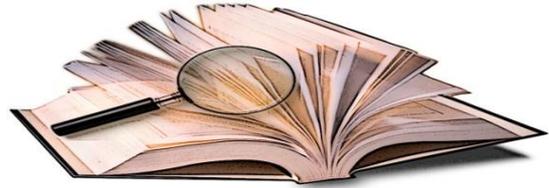
#### 4. Développement du rein :

Le développement rénal chez le souri est similaire à celui de l'humain sauf pour le développement. Il suit les mêmes étapes et voit les stades du pronéphros, du mésonéphros et du métanéphros. Par contre, le développement débute environ au 12<sup>e</sup> jour de la période embryonnaire et se poursuit jusqu'au 10<sup>e</sup> jour post-natal (Dickinson, Walker et al. 2005). Le mésonéphros se forme pendant les jours 12 à 17 post-coïtaux (Rodeck and Whittle 2009). Quant au métanéphros, son développement débute pendant ces mêmes journées jusqu'à terme. Tous les tubules rénaux sont présents à l'exception de l'anse de Henlé, qui se développe dans les jours postnataux et certains autres s'allongent (Little and McMahon2012).

#### 5. Rein et l'élimination des toxiques:

La filtration glomérulaire et la réabsorption tubulaire (98% des électrolytes et d'eau et virtuellement, 100% du glucose et d'acides aminés filtrés par les glomérules) sont les principales étapes de la formation de l'urine. Cependant, le rein exerce plusieurs d'autres

fonctions vitales (régulation de la pression sanguine et du volume extracellulaire, le maintien de la balance acido-basique et électrolytique) qui sont intimement liés à son rôle dans le maintien de l'homéostasie intérieure, permettant de protéger les cellules vis-à-vis des conséquences des variations environnementales de l'organisme. **(Tarloff et Wallace, 2010).**



---

# *Partie pratique*

**I-Matériels et méthodes :**

Les expérimentations effectuées dans cette étude ont été accomplies dans le laboratoire de toxicologie, du département de Biologie appliquée, faculté des Sciences Exactes et Sciences de la Nature et de la Vie.

**I-1. Matériels :****I-1.1. Matériel végétal :**

Le matériel végétal choisi dans la présente étude est représenté par les écorces sèches du grenadier (*Punica granatum. L*). Les fruits ont été récoltés au mois du novembre au niveau de la région Tébessa.

Nous avons récupéré l'écorce de 1500g de fruit frais qui ont donné après épluchage 50 g d'écorce qui ont été séchées à l'obscurité à 28°C. Les écorces séchées, ont été broyées afin d'obtenir une poudre.



**Figure 08 :** Grenade ; écorce de grenade et poudre d'écorce séchée (photo personnelle.2019)

**I-1.2. Matériel animal :**

Les animaux utilisés dans cette expérience sont des souris mâles et femelles *Mus musculus* de la souche BALB/C. Ce sont des mammifères de l'ordre des rongeurs. Largement utilisés dans divers domaines de la recherche (**tableau 7**).

**Tableau 7** : Classification de la souris (Orsini *etal.*, 1983)

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

### I-1.2.1. Entretien des animaux :

Notre étude a été réalisée sur 32 souris « *Mus musculus* » mâles et femelles, âgées entre 02 et 03 semaines, et pesant entre 25 et 45 g au début de l'expérimentation, ces animaux sont mis à l'animalerie de la Faculté des Sciences Exactes et Sciences de la Nature et de la Vie, Université de Tébéssa, à température  $25^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$  et une photopériode naturelle, pendant la durée de l'expérimentation (1 mois), 15 jours adaptation et 15 jours traitement.

**Figure 09** : Les souris « *Mus musculus* » (photo personnelle.2019)

Les souris sont élevées dans des cages en polyéthylène munies d'une mangeoire et d'un biberon d'eau et tapissées d'une litière constituée de copeaux de bois. Les cages ont été nettoyées et la litière changée quotidiennement, et ils sont marquées d'une étiquette porte le type de traitement et le numéro donné pour chaque souris.



**Figure 10:** Conditions d'élevage des souris (photo personnelle.2019)

### I-1.2.2. Mesure de poids :

La mesure de poids est effectuée sur les souris chaque 3 jours pendant toute la durée du traitement, à l'aide d'une petite balance (*Aston*®).

### I-1.2.3. Choix des doses :

Dans notre étude, nous avons utilisé deux pesticides (Deltaméthrine et Lambda cyalothrine) seuls et en mixture à des doses respectivement de 8,96 mg/kg pour Deltaméthrine et 1,5 mg/kg pour Lambda cyalothrine administrées par voie orale « gavage » pendant 15 jours (*Samiran.2010*). Il est à mentionner que ces doses sont très proches à la réalité et sont susceptibles de contaminer la population générale.

Par ailleurs, la dose de l'extrait hydro-méthanolique de l'écorce de grenade utilisée en traitement préventif des animaux contre la toxicité des pesticides utilisés était 1,38mg/kg, selon des études récentes (*Mohamed et al., 2013*).



**Figure 11:** Les pesticides et l'extrait utilisés pour l'expérimentation  
(photo personnelle 2019)

### I-1.3. Matériels chimiques :

Dans ce travail, nous avons utilisé deux pesticides de la famille des pyréthriinoïdes : La solution de deltaméthrine est préparée à partir de sa forme pure (*Deltamethrin*®) fabriqué par **Averstarindustrial Co., Ltd, Sz, La Chine**, que l'on dilue dans l'eau distillée.

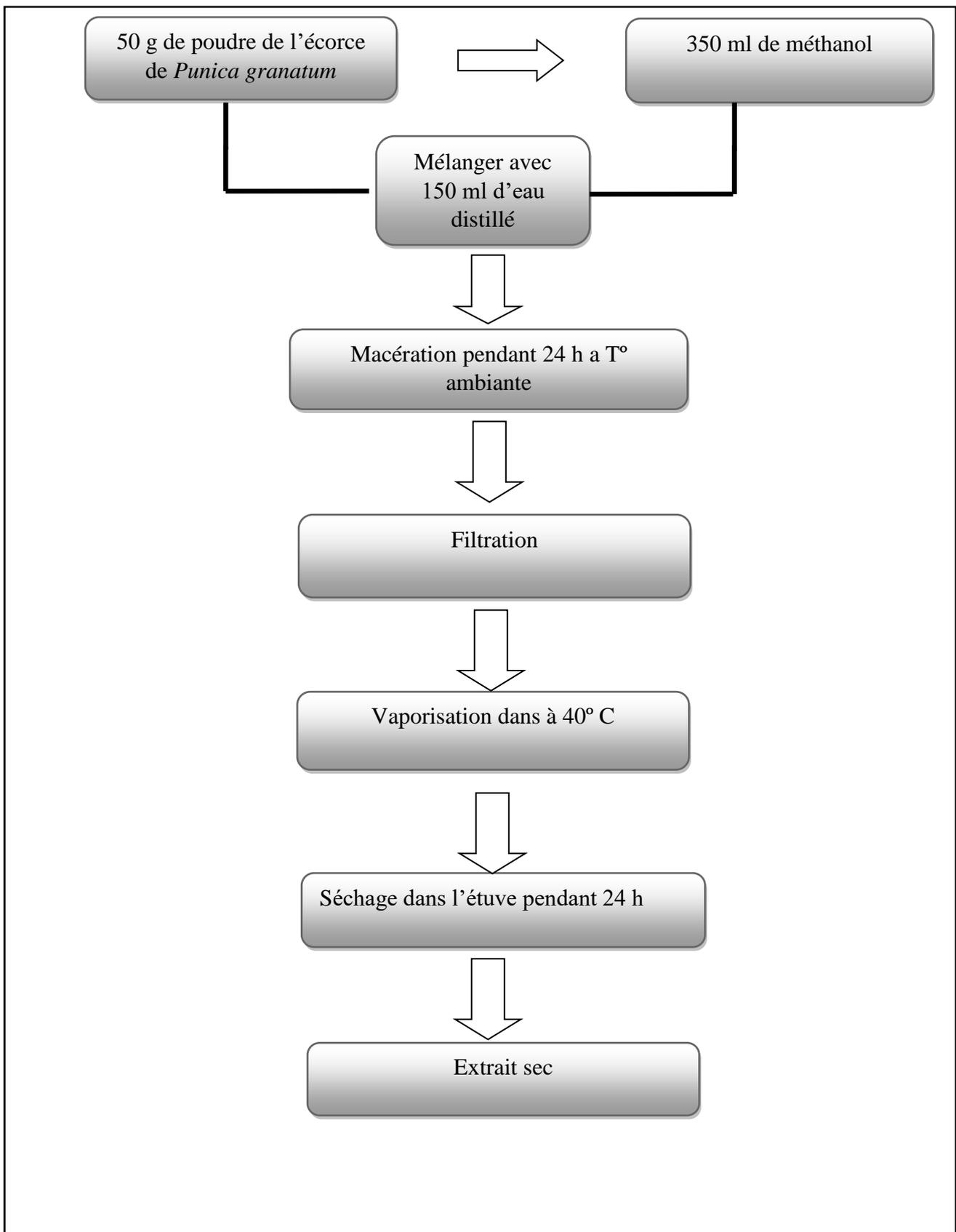
La lambda-cyhalothrine est un insecticide synthétique à base de pyréthriinoïde portant le nom commercial « KARATE ». Elle est un mélange d'isomères hautement actifs de la cyhalothrine. C'est un solide incolore à beige. Il est peu soluble dans l'eau et n'est pas volatil. Sa Formule moléculaire  $C_{23}H_{19}ClF_3NO_3$  et numéro CAS 91465-08-6I.

### I-2. Méthodes :

#### I-2.1. Réalisation de l'extrait hydro-méthanolique:

On prend 50 g de l'écorce de grenade broyée à l'aide d'un mortier meté dans 150 ml d'eau distillée et 350 ml de méthanol et en laisse macérer dans un Erlenmeyer pendant (24 h) pour permettre une meilleure extraction. Après la macération la solution a été filtrée à l'aide d'un entonnoire sur coton.

La solution récupérée après la filtration est réalisée à l'aide d'un évaporateur rotatif (rotavapor) à une température comprise entre 40°C à 45°C pour l'évaporation du méthanol, on obtenir un liquide visqueux, après on mètre l'extrait dans une boîte de pétrie et ont mis dans une étuve pendant 48 h, afin d'obtenir un extrait sec.



**Figure 12 :** L'extraction hydro-méthanolique de l'écorce de *Punica granatum*

**I-2.2. Rendement d'extraction :**

Le rendement de l'extrait hydro-méthanolique est le rapport entre le poids de l'extrait et le poids de la matière sèche de la plante.

$$R = (P_{\text{ext}}/P_{\text{ms}}) \times 100$$

**R** : Rendement en EM (en %).

**P<sub>ext</sub>** : Poids de l'extrait en g.

**P<sub>ms</sub>** : Poids de la matière sèche en g.

**I-2.3. Traitement des souris :**

Les 32 souris ont été réparties en 8 lots de 4 souris chacun, il s'agit de :

**Lot 1 : Témoin (T)** : reçoit l'eau physiologique pendant 15 jours.

**Lot 2 : Extrait (Ext)** : reçoit la concentration de 50 µl /g/j pendant 15 jours.

**Lot 3 : Deltaméthrine (DM)** : reçoit la concentration 50 µl /g/j pendant 15 jours.

**Lot 4 : Lambda cyalothrine (Lct)** : reçoit la concentration 3,8 µl /g/j pendant 15 jours.

**Lot 5 : Deltaméthrine/ Lambda cyalothrine (DM/Lct)** : reçoit la concentration 50 µl /g/j de DM et la concentration 3,8 µl /g/j de Lct pendant 15 jours.

**Lot 6 : Extrait/ Deltaméthrine (Ext/DM)** : reçoit la concentration 50 µl /g/j de l'Ext après deux heures reçoit la concentration 50 µl /g/j de DM pendant 15 jours.

**Lot 7 : Extrait / Lambda cyalothrine (Ext/Lct)** : reçoit la concentration 50 µl /g/j de l'Ext après deux heures reçoit la concentration 3,8 µl /g/j de Lct pendant 15 jours.

**Lot 8 : Extrait / Lambda cyalothrine/ Deltaméthrine (Ext/Lct/DM)** : reçoit la concentration 50 µl /g/j de l'Ext après deux heures reçoit la concentration 3,8 µl /g/j de Lct et la concentration 50 µl /g/j de DM pendant 15 jours.



**Figure 13 :** Traitement des souris (des photos personnelles 2019)

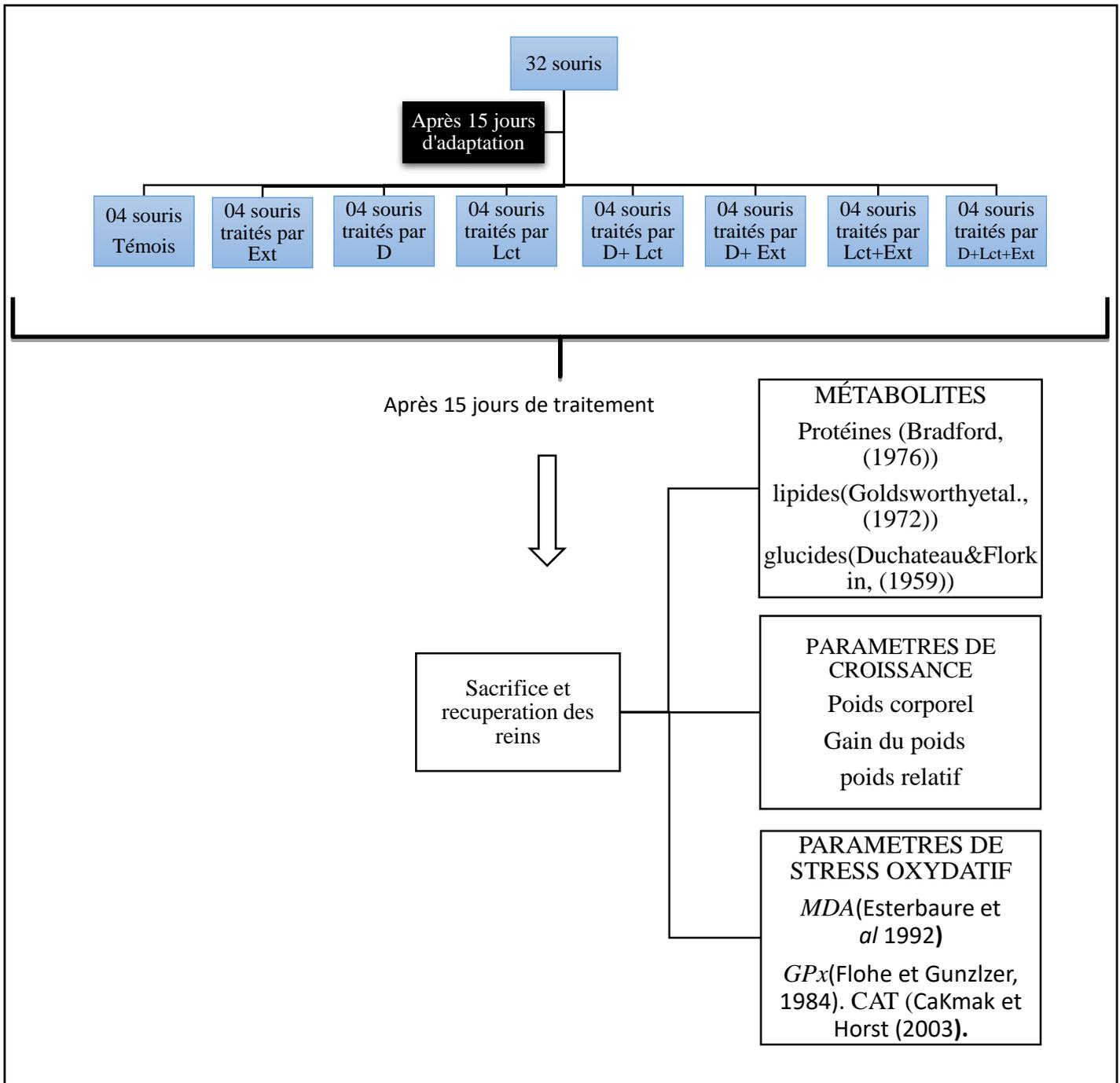
#### **I-2.4. Sacrifice et prélèvement des reins :**

Après 15 jours du traitement les souris ont été sacrifiées par décapitation. Après la dissection, les reins ont été récupérés et pesés puis conservés dans un papier aluminium au congélateur à  $-80^{\circ}\text{C}$  jusqu'à l'analyse :

- Le dosage des métabolites (glucide, protéine, lipides)
- Le dosage des paramètres du stress oxydant (GPx, MDA, CAT)



**Figure14:** Sacrifice et prélèvement des reins (photos personnelles 2019)



**Figure 15 :** Schéma récapitulatif du protocole expérimental.

### I.2.5. Poids relatif des reins :

Le poids relatif des reins extraits des souris (PRr de poids corporel) est calculé par rapport au poids total de souris selon la formule suivant :

$$\text{PRr (\%)} = \text{Pr/Pt} \times 100$$

**Pr :** poids du rein (mg)

**Pt :** poids total de souris (g)

**PRr** : Poids relatif du rein (mg)

### **I-2.6. Préparation de l'homogénat :**

Quatre grammes de tissu pulmonaire ont été homogénéisés dans 08 ml de solution de tampon phosphate salin (TBS ; pH 7,4). Ensuite les homogénats ont été centrifugés à 3000 t/min pendant 15 min à 4°C et le surnageant résultant a été utilisé pour la détermination de taux de protéines, MDA, GPx, et le CAT

### **I-3. Analyse des paramètres biochimiques :**

#### **I-3.1. Dosage des métabolites ( glucide ,protéine ,lipide) :**

Le dosage des différents métabolites a été réalisé selon le procédé de (**Shibkoetal., 1966**), et les principales étapes sont résumées dans la Figure 09. Les échantillons (les reins des souris) sont placés dans des tubes eppendorf contenant 1 ml d'acide trichloracétique (TCA) à 20 % et broyés. Après une première centrifugation (5000 trs / min, 10 min), le surnageant I obtenu est utilisé pour le dosage des glucides totaux selon la méthode de **Duchateau & Florkin, (1959)**. Au culot I, on ajoute 1 ml de mélange éther/chloroforme (1V/1V) et après une seconde centrifugation (5000 trs/min, 10 min), on obtient le surnageant II et le culot II, le surnageant II sera utilisé pour le dosage des lipides (**Goldworthy et al., 1972**) et le culot II, dissout dans l'eau distillée, servira au dosage des protéines selon Bradford, (1976).

## Dosage des métabolites

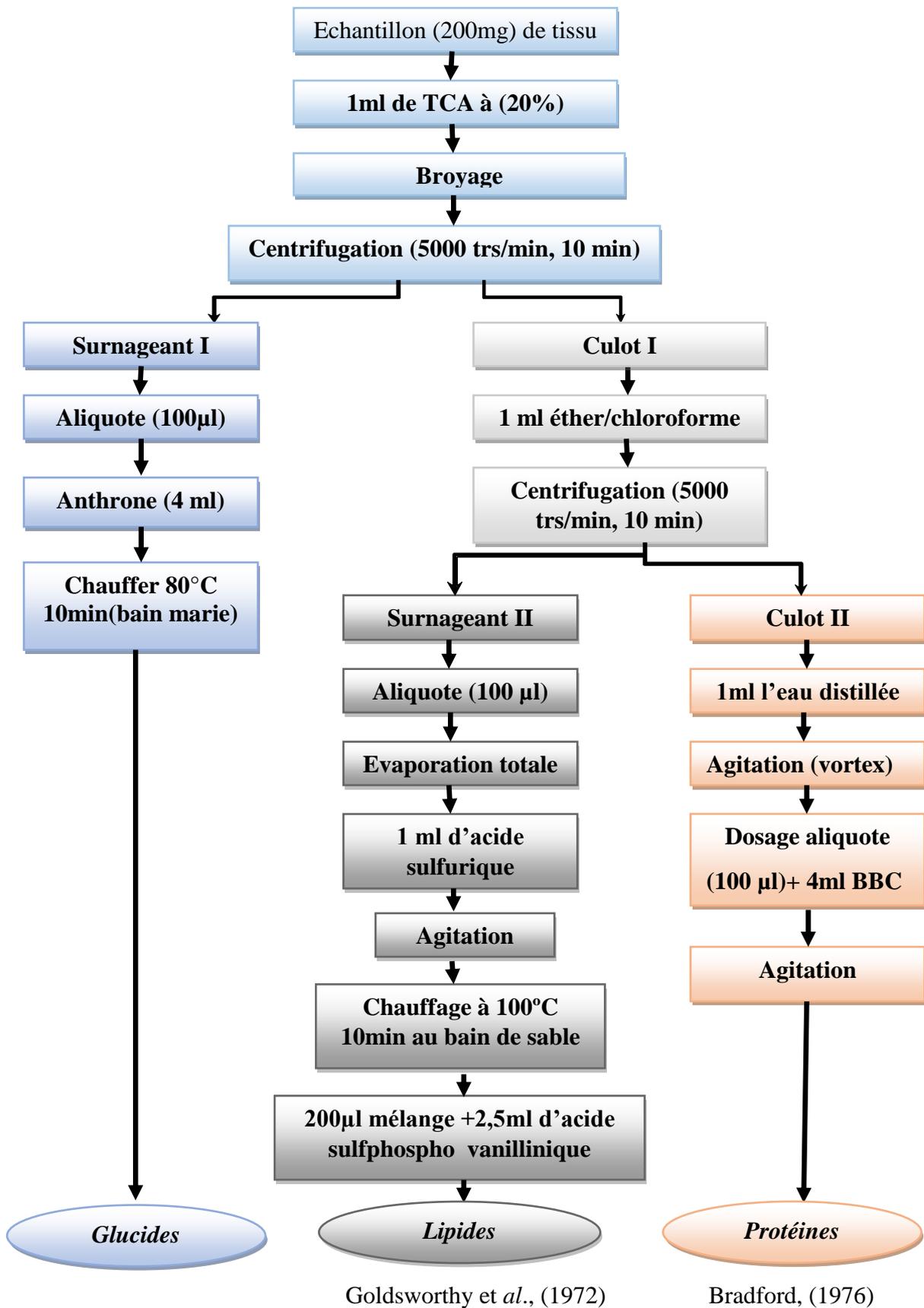


Figure 16 : Extraction et dosage des glucides, protéines et lipides totaux (Shibko *et al.*, 1966).

**I-3.1.1. Dosage de protéine :**

Le dosage des protéines a été déterminé selon la méthode de **(Bradford, 1976)** qui consiste à utiliser le bleu de Coomassie comme réactif. Ce dernier réagit avec les groupements amines ( $-\text{NH}_2$ ) des protéines pour former un complexe de couleur bleu. L'apparition de la couleur bleue reflète le degré d'ionisation du milieu acide et l'intensité correspond à la concentration des protéines.

Pour accomplir cet essai, nous avons procédé comme suit :

- Prélever 0.1 ml de l'homogénat.
- Ajouter 5 ml de réactif de bleu de Coomassie.
- Agiter et laisser reposer 5 minutes.
- Lire à 595 nm les densités optiques contre le blanc.

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

**I-3.1.2. Dosage de glucide :**

Le dosage des glucides totaux a été réalisé selon la méthode de **Duchateau et Florkin (1959)**. Cette méthode utilise l'anthrone comme réactif (150 mg d'anthrone, 75 ml d'acide sulfurique et 25 ml d'eau distillé) et une solution mère de glucose (1 g/l) comme standard

La méthode consiste à additionner à une fraction aliquote 100  $\mu\text{l}$  du surnageant contenu dans un tube à essai, 4 ml de réactif d'Anthrone. Après chauffage du mélange dans un bain marie à 80 °C pendant 10 min. Une coloration verte se développe, L'intensité de la coloration mesurée à une longueur d'onde de 620 nm est proportionnelle à la quantité de glucide présent dans l'échantillon.

La gamme d'étalonnage est effectuée à partir d'une solution mère du glucose (1 mg/ml) (Annexe 2).

**I-3.1.3. Dosage de lipide :**

Le taux des lipides a été déterminé selon la méthode de **(Goldsworthy et al., 1972)**. Cette méthode utilise la vanilline comme réactif (0,38 g de vanilline, 195 ml d'acide ortho phosphorique à 85% et 55 ml d'eau distillée) et solution mère de lipides (2,5 mg/ml) comme standard. Et ajoutée 1 ml d'acide sulfurique (98%), après agitation, les chauffés un bain marie

(100°C pendant 10min) de chaque tube 200µl sont ensuite prélevés et il est ajouté 2,5ml de réactif sulfo-phospho-vanillinique.

Les absorbances ont été lues après 30 min d'obscurité à une longueur d'onde de 530 nm.

La gamme d'étalonnage est présentée dans (Annexe 3).

#### I.4. Analyse des paramètres enzymatiques :

##### I-4.1. Dosage de l'activité 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 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en présence du glutathion réduit (GSH), ce dernier est transformé en (GSSG) sous l'influence de GPX selon la réaction suivante :



Le protocole expérimental suivi comme suit :

- Prélever 0,2 ml de l'homogénat (surnageant).
- Ajouter 0,4 ml de GSH (0,1 mM).
- Ajouter 0,2 ml de solution tampon TBS (Tris 50 mM, Na Cl 150 Mm Ph 7,4).
- **Incuber au bain marie à 25°C. pendant 5 min.**
- A ajouter 0,2 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (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 un bain de glace pendant 30 minutes.
- Centrifuger durant 10 minutes à 3000 tours /minutes.
- Prélever 0,48 ml de surnageant.
- Ajouter 2,2 ml de solution tampon TBS.
- Ajouter 0,32 ml de DTNB (1 mM).
- Mélanger et après 5 minutes lire les densités optiques à 412 nm.

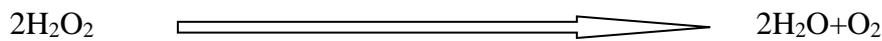
La détermination de l'activité enzymatique de la GPx se fait à l'aide de la formule suivante :

$$\text{GPx}(\mu\text{mol. mg de protéine}) = \frac{(\text{DOe} - \text{DOb}) \cdot 0,04}{\text{DOb}}$$

- **DO** : échantillon : Densité optique de l'échantillon.
- **DO étalon** : Densité optique de l'étalon.
- **0,04** : Concentration de substrat (GSH).

#### I-4.2. Dosage de l'activité catalase (CAT) :

La catalase est une enzyme antioxydante la plus couramment mesurée dans les recherches liées aux radicaux libres. La catalase est l'enzyme qui élimine le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ). Cette enzyme intervient dans la défense de la cellule contre le stress oxydatif en catalysant la dismutation du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) toxique en eau et en oxygène (**Regoli et Pricipato, 1995; Boucenna, 2010**).



L'activité du catalase est déterminée selon la méthode de **CaKmak et Horst (2003)**. Le principe repose sur la disparition de l' $H_2O_2$  à 25°C par la présence de catalase. Pour réaliser ce protocole, nous avons suivi les étapes suivantes :

- Prélever 20  $\mu$ l de surnageant
- Ajouter 200  $\mu$ l de peroxyde d'hydrogène
- Ajouter 780  $\mu$ l TBS.
- Pour le blanc : mélange 780  $\mu$ l TBS + 200  $\mu$ l  $H_2O_2$  + 20  $H_2O$

La réaction est contrôlée par une lecture continue pendant 2 minutes durant 15 secondes à une longueur d'onde à 240 nm.

L'activité CAT est calculée par la formule suivante :

$$X = \frac{(\Delta DO \times 10)}{(\epsilon \times L \times 0,05 \times \text{mg de protéines})}$$

**X** : micromole de substrat hydrolysé par minute et par mg de protéines ( $\mu$ M/mn /mg de protéines).

**$\Delta$  DO** : différences de la densité optique obtenue après hydrolyse du substrat pendant une minute.

**$\epsilon$**  : Le coefficient d'extinction du  $H_2O_2$  ( $3900 \mu M^{-1} \cdot cm^{-1} \cdot L$ )

**L** : longueur de la cuve utilisée (1cm).

**Mg de protéines** : quantité de protéines exprimée en mg.

**I-5. Analyse des paramètres non enzymatiques :****I-5.1. Dosage de malondialdéhyde (MDA) tissulaire :**

Le dosage du malondialdéhyde (MDA) est réalisé selon la méthode de (**Esterbaure 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 (TBA), pour former un pigment rose.

Pour réaliser ce protocole, nous avons suivi les étapes suivantes :

- Prélever 375µl du surnageant dans un tube sec
- Ajouter 150µl de solution tampon TBS (Tris 50 mM, Na Cl 150 Mm Ph 7,4).
- Ajouter 375µl de solution TCA-BHT (TCA 20%, BHT 1%).
- Le mélange est vortexé et centrifugé à 1000 tours/min pendant 10 min.
- Prélever 400 µl de surnageant.
- Ajouter 80µl de d'HCl 0,6 M.
- Ajouter 320µl de solution Tris-TBA (Tris 26 mM, TBA 120 mM).
- Le mélange est vortexé et est ensuite incubé au bain marie à une température de 80°C pendant 10 minutes.
- Lue La densité optique à l'aide d'un spectrophotomètre à  $\lambda = 530$  nm contre un blanc ou du tampon tris-HCl remplace le surnageant.

Le taux du MDA est déterminé selon la formule suivante :

$$X = \frac{\Delta Do/mn}{156} \times \frac{Vt}{Vs} / \text{mg de protéines}$$

**X : (Taux du MDA):** micromole de substrat hydrolyse par mg de protéines ( $\mu\text{M}/\text{mg}$  de protéines).

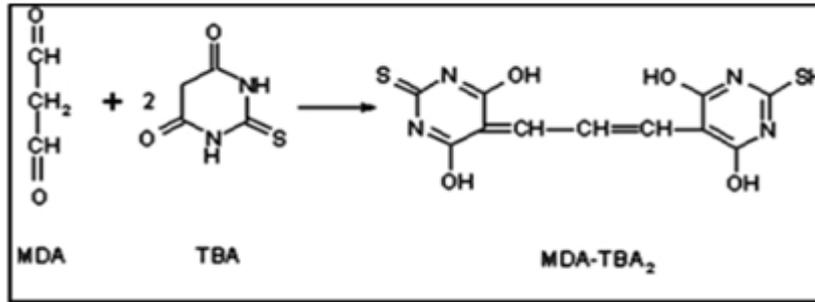
**$\Delta Do$  :** différence de la densité optique obtenue après hydrolyse du substrat.

**156 :** coefficient d'extinction molaire du TBA.

**$Vt$  :** volume total dans la cuve : 1ml (volume total du butanol récupère renfermant les Complexes TBA/MDA).

**$Vs$  :** volume du surnageant utilise dans le dosage : 0,5 ml.

**mg de protéines :** quantité de protéines exprimée en mg.



**Figure 17:** Mécanisme réactionnel de l'MDA (Ligor et al.,2011).

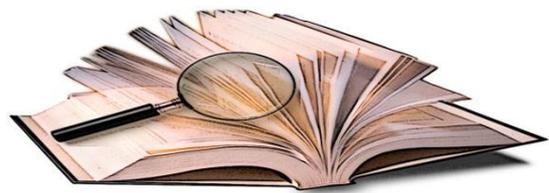
### I-6. Analyse statistique :

Les quantités des métabolites (protéines, glucides et lipides) sont déterminées à partir des courbes d'étalonnage en utilisant Excel.

L'analyse statistique des données est effectuée par le test ANOVA à One-Wey suivipar le test de Tukey et du Dunnet pour la comparaison entre les différents lots entre eux et la comparaison avec le lot témoin. Cette analyse a été faite grâce au logiciel Minitab (Version 17).

Les différences sont considérées comme :

- Significative lorsque (P <0,05).
- Hautement significative lorsque (P <0,01).
- Très hautement significative lorsque (P <0,001).
- Avec p : seuil de signification.



---

***Résultats***  
***et***  
***Discussions***

### II- Résultats :

#### II-1. Rendement d'extraction hydro-méthanolique de l'écorce de grenade :

Le rendement en extrait hydro-méthanolique utilisé dans cette étude est :

$$R (\%) = (P_{\text{ext}}(\text{g})/P_{\text{ms}}(\text{g}) ) * 100$$

$$R (\%) = 7,79 \text{ g} / 50 \text{ g} * 100$$

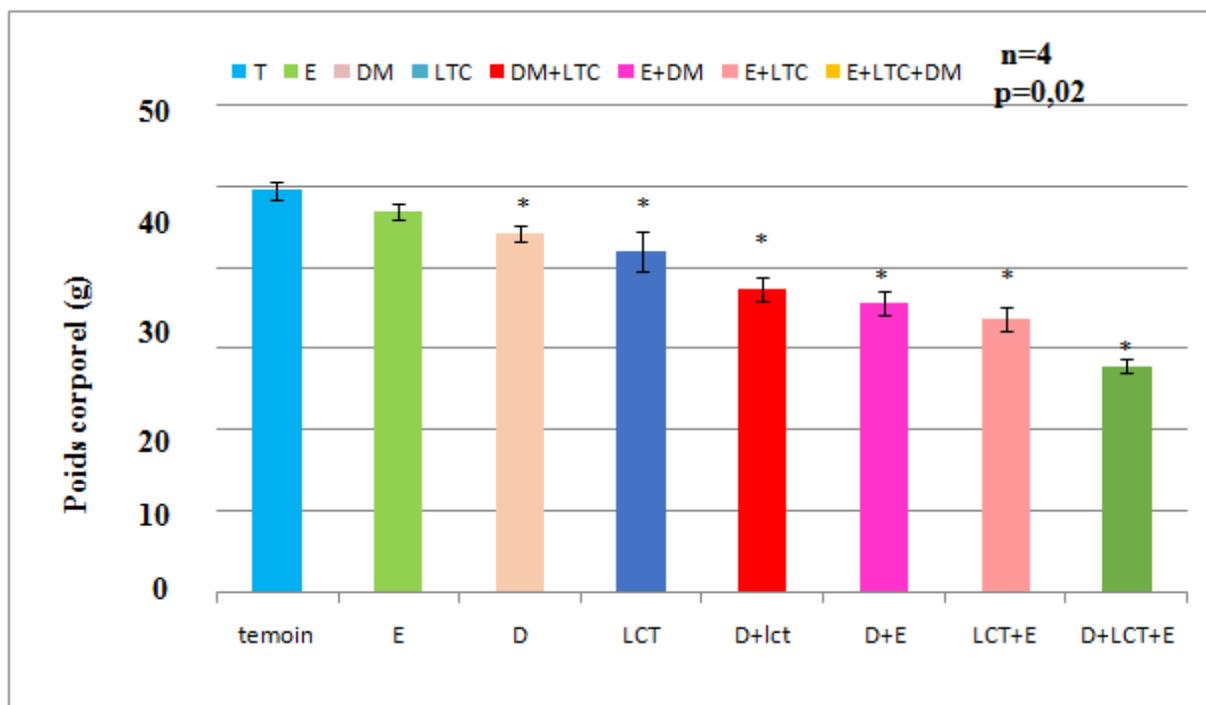
$$R (\%) = 15,58\%$$

#### II-2. Effets des pesticides et de l'extrait hydro-méthanolique de l'écorce de la grenade sur les paramètres de croissance globale des souris :

Les résultats obtenus lors de l'évaluation des paramètres de croissance en terme de poids corporel, le gain de poids et le poids relatif durant les 15 jours du traitement des différents groupes des souris par la deltaméthrine et lambda cyhalothrine, leur mixture et l'extrait seul ou associé avec les pesticides sont illustrés par les figures 18,19 et 20.

##### II-2.1. Poids corporel :

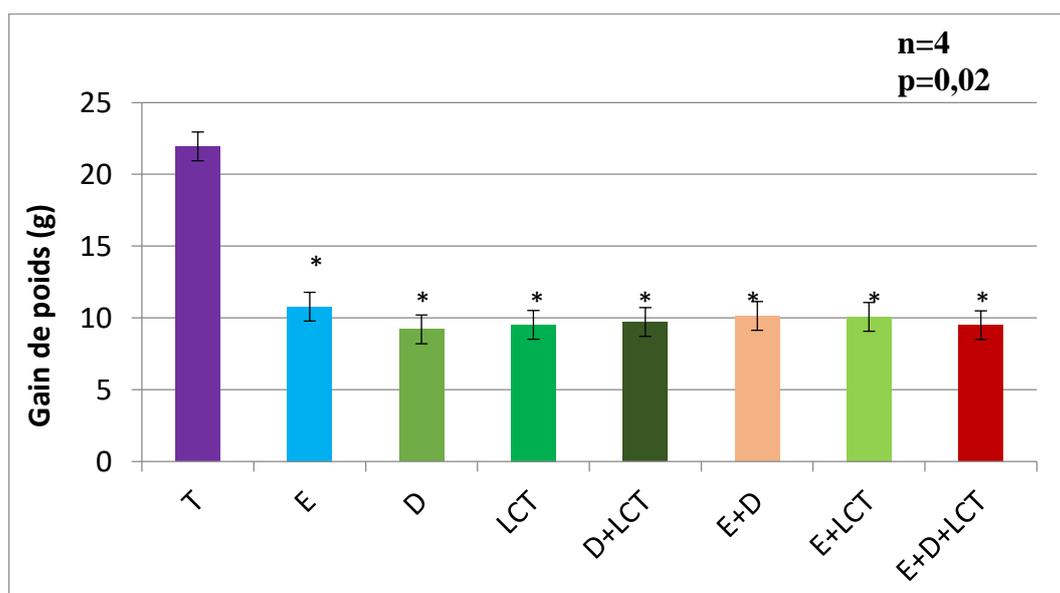
Les résultats obtenus montrent qu'il y a une diminution significative ( $P < 0,05$ ) du poids corporel chez les souris traitées par les deux pesticides ; la DM et la LCT ainsi que leur mixture par rapport aux témoins (figure 18). Les lots traités par les pesticides associés à l'extrait montrent une diminution significative ( $P < 0,05$ ) du poids par rapport aux lots traités par les pesticides seuls et en mixture, et celui traité par l'extrait enregistré une diminution du poids par rapport au lot témoin.



**Figure 18** :L'évaluation du poids corporel (PC) chez les différents lots expérimentaux traités par les pesticides et l'extrait durant 15 jours du traitement ( $P<0,05$ ).

### II-2.2. Gain de poids :

Les résultats obtenus, présentés dans la (figure 19), montrent une diminution significative ( $P<0,05$ ) du gain de poids chez tous les lots traités par la DM, LCT, leur combinaison entre eux, l'extrait et leur mixture avec les pesticides par rapport au lot témoin.

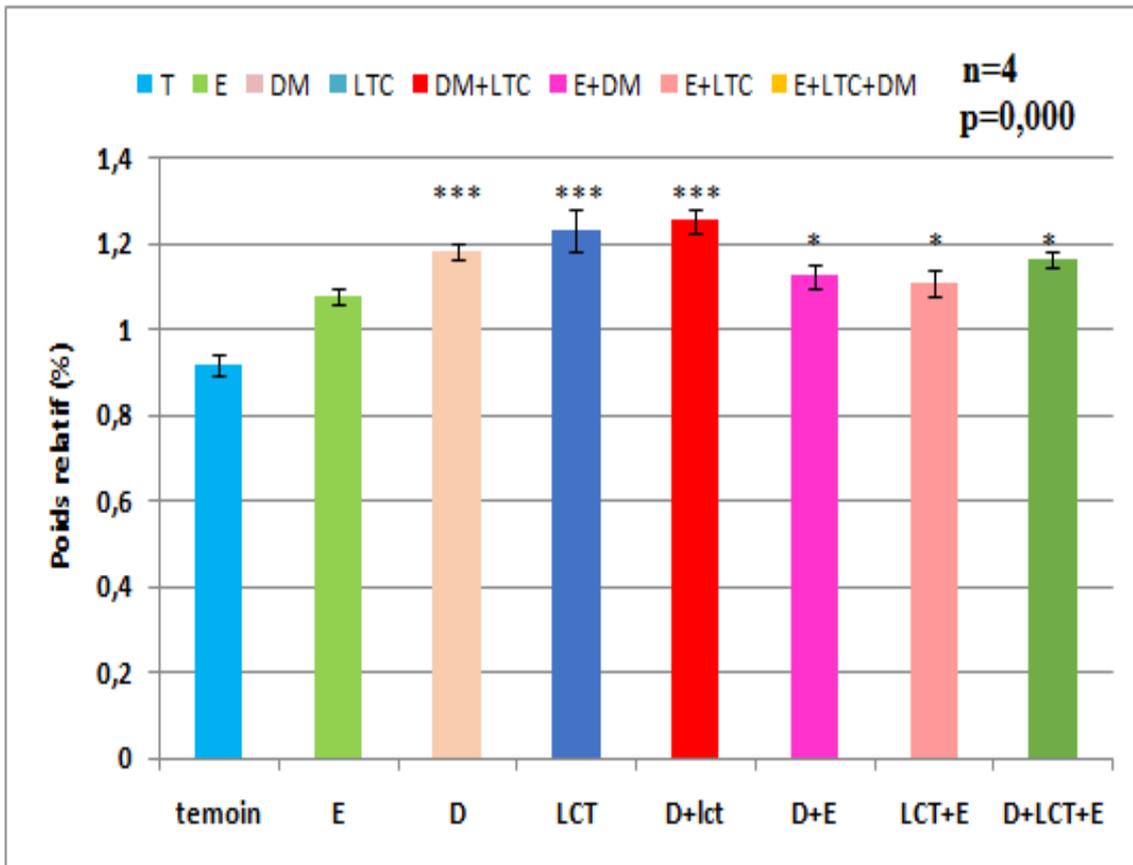


**Figure 19** :L'évaluation du gain de poids corporel (GP) chez les souris témoins et traités par les pesticides et l'extrait durant 15 jours du traitement ( $P<0,05$ ).

**II-2.3. Poids relatif :**

Les résultats obtenus présentés dans la (figure 20) montrent qu'il y a une augmentation très hautement significative ( $P < 0,001$ ) du poids relatif des reins chez les lots traités par la DM, LCT et aussi leur combinaison par rapport au lot témoin.

Par ailleurs une diminution significative du poids relatifs des reins chez les lots traités par l'extrait en mixture avec les pesticides par rapport aux lots traités par les pesticides seuls ou on combinaison entre eux.



**Figure 20 :** L'évaluation du poids relatif des reins(PRr) chez la souris traitée par les pesticides et l'extrait durant 15 jours du traitement ( $P < 0,001$ ).

### II-3. Étude des paramètres biochimiques, enzymatiques et non enzymatique :

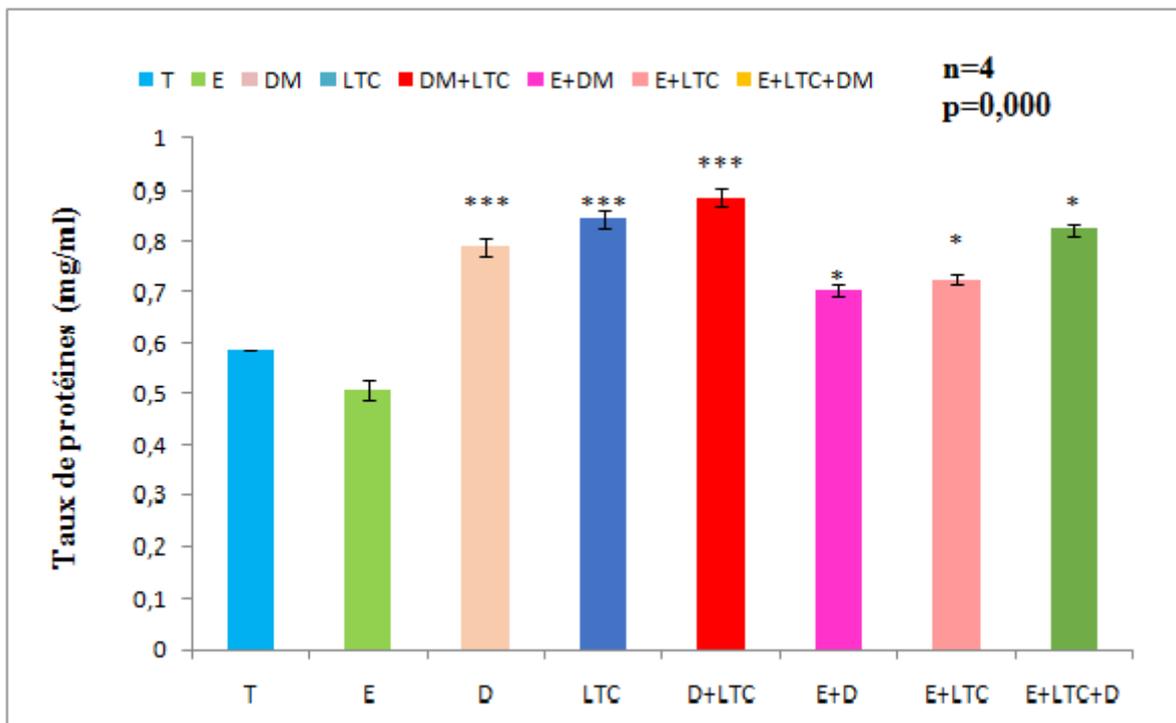
#### II-3.1. Effets des pesticides et de l'extrait hydro-méthanolique de l'écorce de la grenade sur les paramètres biochimiques chez les souris :

##### II-3.1.1. Taux de protéine :

Les résultats obtenus présentés dans la (figure 21) montrent qu'il y a une augmentation très hautement significative du taux de protéine des reins ( $p < 0,001$ ) chez les lots traités par la DM, LCT individuellement et en mixture entre eux comparant au lot témoin.

Par ailleurs une diminution significative du taux de protéines des reins chez les lots traités par les pesticides en mixture avec l'extrait par rapport aux lots traités par les deux pesticides et leurs combinaisons entre eux.

L'extrait hydro-méthanolique de l'écorce de la grenade a un effet positif sur le taux de protéines chez les souris traitées par la DM et la LCT, ainsi son utilisation a permis de corriger l'effet toxique de ces pesticides.



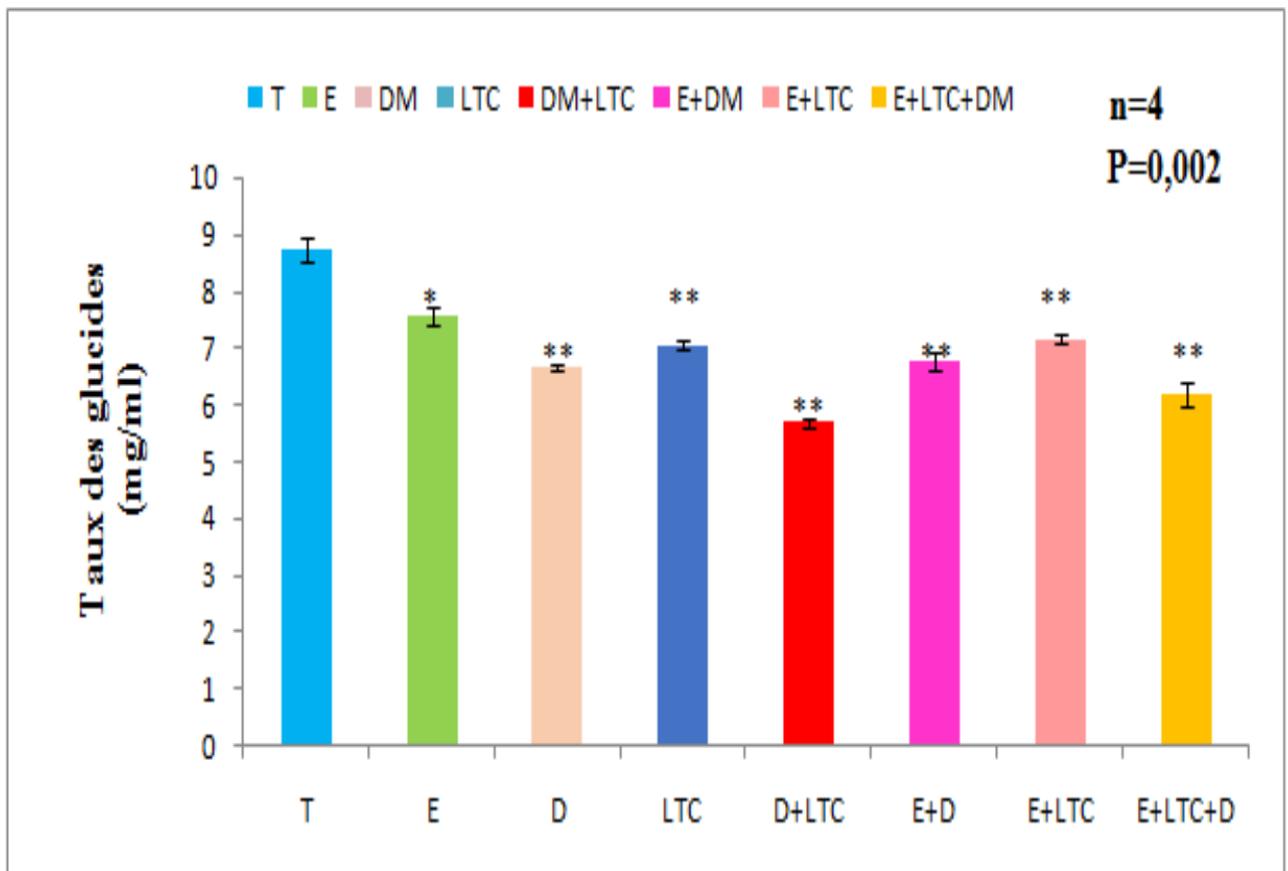
**Figure 21 :** Taux de protéines (mg/ml) dans les reins chez les souris des différents lots expérimentaux durant 15 jours du traitement ( $p < 0,001$ ).

### II-3.1.2. Taux des glucides :

Les résultats obtenus présentés dans la (figure 22) montrent qu'il y a une diminution hautement significative de taux des glucides dans les reins chez les souris traitées par DM, LCT et la mixture de ces deux pesticides comparant au lot témoin.

Par ailleurs une augmentation significative de taux des glucides dans les reins chez les lots traités par l'extrait seul et on combinaison avec DM et LCT par rapport aux lots traités par ces pesticides.

Les résultats montrent aussi une diminution significative de taux des glucides chez le lot traité par l'extrait par rapport au lot témoin.



**Figure 22 :** Taux des glucides (mg/ml) dans les reins chez les souris des différents lots expérimentaux pendant 15 jours du traitement ( $p < 0,01$ ).

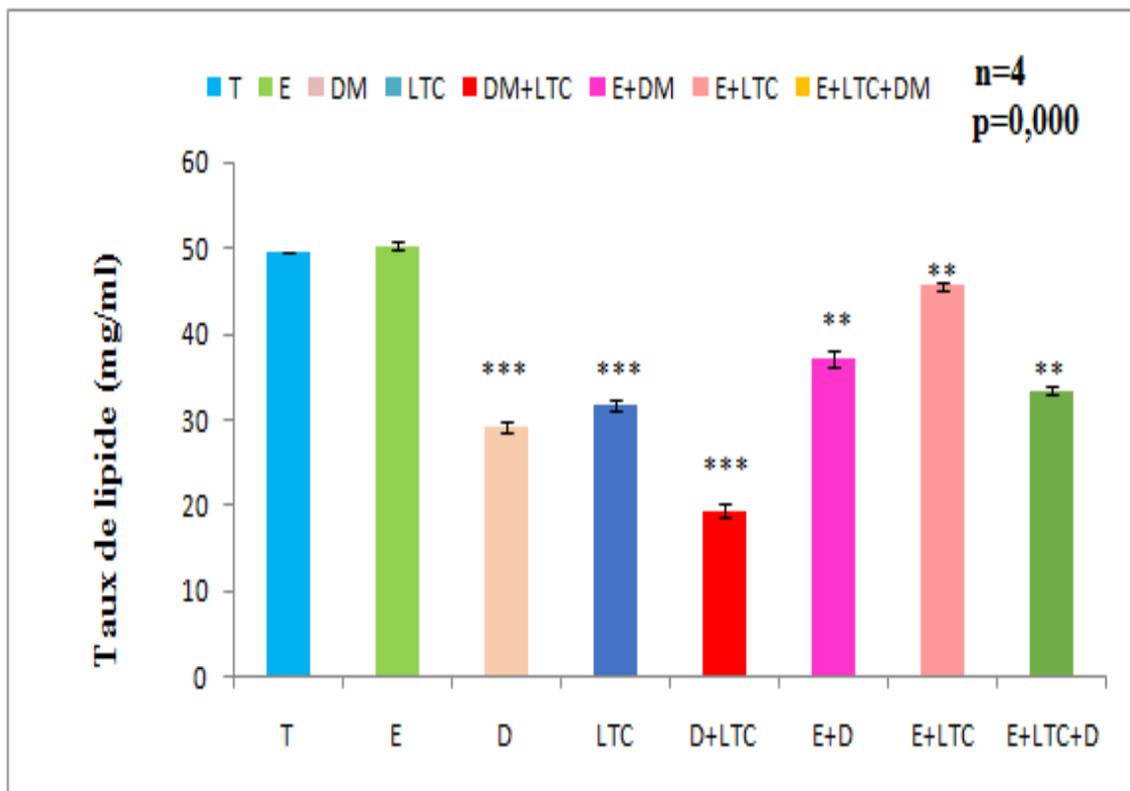
### II-3.1.3. Taux de lipide :

Les résultats obtenus présentés dans la (figure 23) montrent qu'il y a une diminution très hautement significative de taux des lipides dans les reins chez les souris traitées par DM, LCT et la mixture de ces deux pesticides comparant au lot témoin.

Par ailleurs une augmentation hautement significative de taux des lipides dans les reins chez les lots traités par l'extrait on combinaison avec la DM et LCT par rapport aux lots traités par ces pesticides.

Les résultats montrent aussi qu'aucune diminution ou augmentation de taux des lipides chez le lot traité par l'extrait par rapport au lot témoin.

L'extrait a un effet positif sur le taux de lipides chez les souris traitées par la DM et la LCT, ainsi son utilisation a permis de corrigé l'effet toxique de ces pesticides.

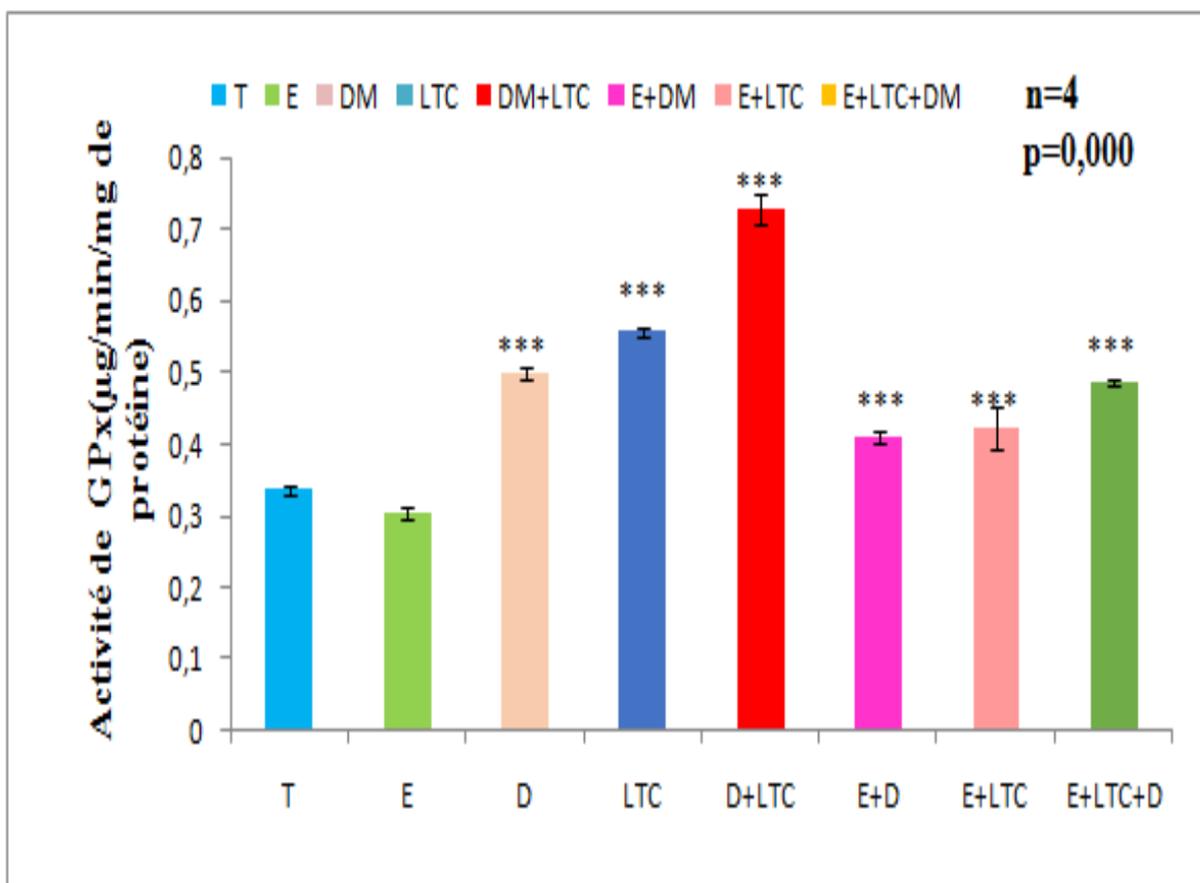


**Figure 23 :** Taux des lipides (mg/ml) dans les reins chez les souris des différents lots expérimentaux pendant 15 jours du traitement ( $p < 0,001$ ).

### II-3.2.Effets des pesticides et de l'extrait hydro-méthanolique de l'écorce de la grenade sur les paramètres enzymatiques chez les souris :

#### II-3.2.1. Effet des pesticides et de l'extrait hydro-méthanolique de l'écorce de la grenade sur les variations de l'activité de la GPx :

Les résultats obtenus présentés dans la (figure 24) montrent qu'il y a une augmentation très hautement significative ( $P < 0,001$ ) de l'activité de la GPx dans les reins chez les lots traités par la DM, LCT et leur mixture entre eux par rapport au lot témoin. Ils montrent aussi une diminution très hautement significative de l'activité de la GPx dans les reins chez les lots traités par la DM, LCT en mixture avec l'extrait par rapport aux lots traités par ces pesticides.

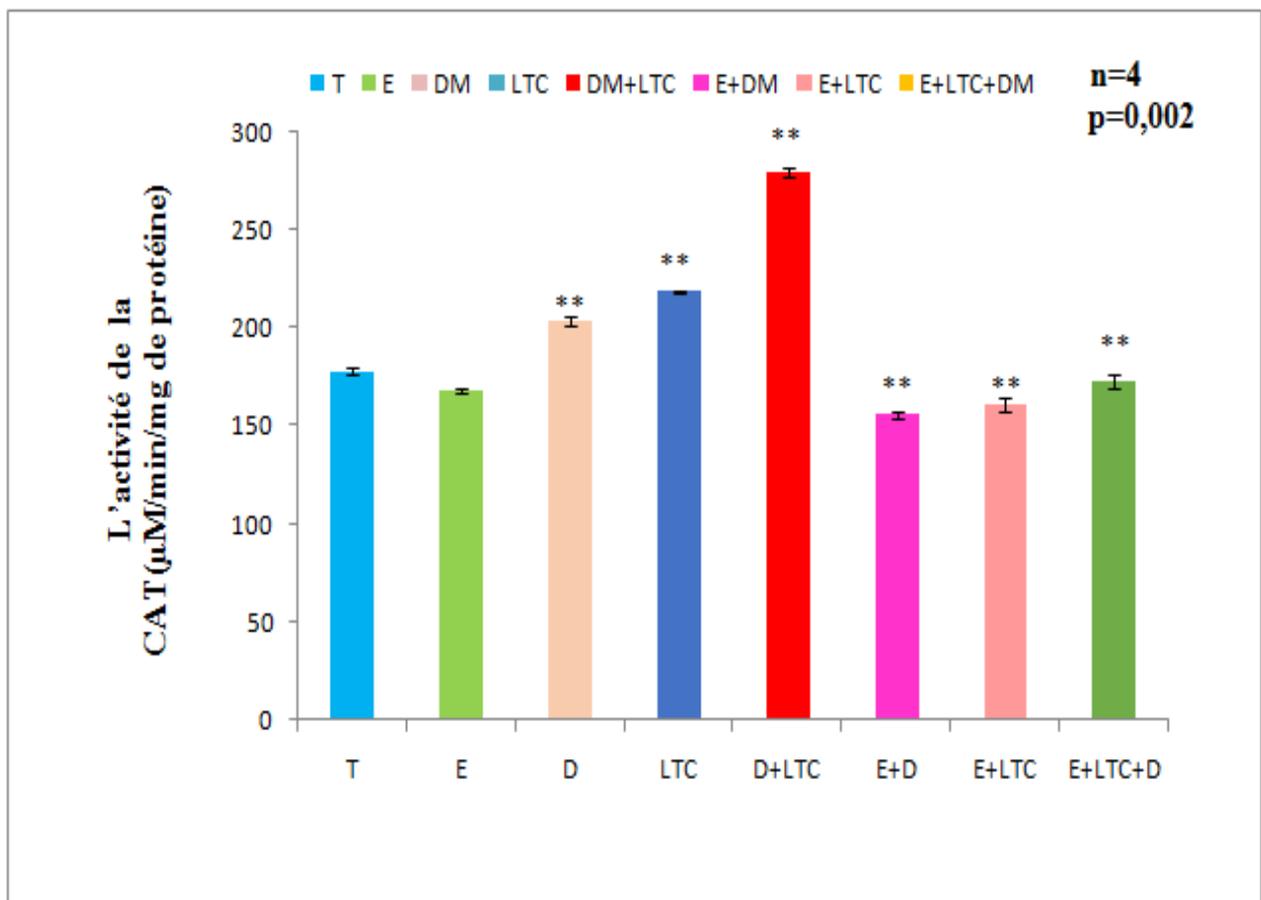


**Figure 24 :** L'évaluation de l'activité de la GPx ( $\mu\text{g}/\text{min}/\text{mg}$  de protéines) chez les souris traitées par les pesticides et l'extrait durant 15 jours du traitement. ( $p < 0,001$ ).

### II-3.2.2 Effet des pesticides et de l'extrait hydro-méthanolique de l'écorce de la grenade sur les variations de l'activité de la CAT :

Les résultats obtenus présentés dans la (figure 25) montrent qu'il y a une augmentation hautement significative ( $P < 0,01$ ) de l'activité de la CAT dans les reins chez les lots traités par les pesticides individuellement et en mixture entre eux par rapport au lot témoin.

Par ailleurs une diminution hautement significative de l'activité de la CAT dans les reins chez les lots traités par la DM, LCT et l'extrait en mixture en comparant aux lots traités par ces pesticides.



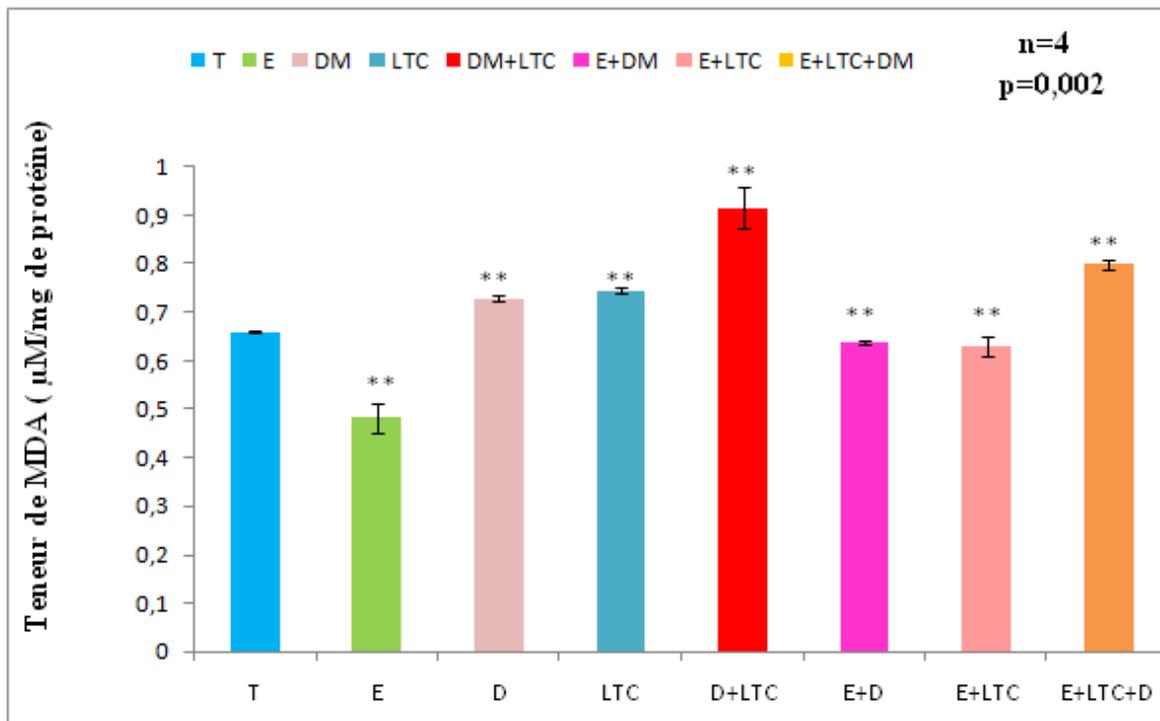
**Figure 25 :** L'évaluation de l'activité de la CAT ( $\mu\text{g}/\text{min}/\text{mg}$  de protéines) chez les souris traitées par les pesticides et l'extrait durant 15 jours du traitement. ( $p < 0,01$ ).

**II-3.3. Effet des pesticides et de l'extrait hydro-méthanolique de l'écorce de la grenade sur les paramètres non enzymatiques :**

**II-3.3.1. Effet des pesticides et de l'extrait hydro-méthanolique de l'écorce de la grenade sur le teneur de la malondialdéhyde MDA :**

Les résultats obtenus présentés dans la (figure 26) montrent qu'il y a une augmentation hautement significative ( $p < 0,01$ ) de teneur de la malondialdéhyde de MDA dans les reins chez les lots traités par la DM, LCT et leurs combinaisons par rapport au lot témoin.

Par ailleurs une diminution hautement significative de teneur de MDA est induite par l'utilisation de l'extrait, ce qui correspond à un effet positif de l'extrait sur le traitement par les deux pesticides DM, LCT et leurs mixtures pour corriger l'effet toxique de ces pesticides.



**Figure 26 :** La teneur de la malondialdéhyde MDA ( $\mu\text{M}/\text{mg}$  de protéine) dans les reins des souris traitées par les pesticides et l'extrait durant 15 jours du traitement ( $p < 0,01$ ).

**III-Discussion :**

Les pesticides sont des produits chimiques utilisés comme moyen de lutte antiparasitaire (insecticides, herbicides, fongicides...) (**Leyral et Vierling., 2007**). Les insecticides sont utilisés contre les insectes nuisibles et les vecteurs de maladies mortelles telles que le paludisme, la fièvre jaune, trypanosomais, la peste et le typhus (**Inserm, 2013**).

La deltaméthrine et la lambda cyhalothrine sont les insecticides les plus fréquemment appliqués dans le secteur agricole et forestier, ils sont utilisés aussi pour lutter contre le doryphore de la pomme de terre, la cicadelle, le ver-gris, la mineuse, la légionnaire bertha, l'altise, la fausse-teigne des crucifères, la sauterelle et la punaise grise dans divers pays (**Yadav et al., 2001**).

Ainsi le but de ce travail était en premier lieu la mise en évidence d'une éventuelle toxicité de ces deux pesticides sur le système rénal des souris en termes de paramètres de croissance, paramètres métaboliques et bio-marqueurs du stress oxydatif.

Le deuxième objectif était de démontrer l'effet protecteur de l'extrait hydro-méthanolique de l'écorce de grenade contre cette toxicité.

Dans notre travail nous avons choisi comme modèle biologique les souris *Mus musculus* de souche BALB/C qui sont largement utilisées dans les recherches scientifiques à cause des similitudes physiologiques avec l'être humain et la possibilité d'extrapoler les résultats vers l'Homme (**Orsini et al., 1989**).

Nous avons cherché à évaluer les effets toxiques des pesticides et de l'extrait sur les paramètres de la croissance globale (poids corporel, gain de poids, et poids relatif au niveau rénal) et l'effet toxique au niveau rénal par le dosage de certains bio-marqueurs biochimiques (protéines, lipides et glucides), enzymatiques (GPx et CAT) et non enzymatique (MDA).

D'une manière générale, les résultats de la présente étude montrent que l'extrait hydro-méthanolique de l'écorce de grenade utilisé à la dose de 50 µl/g/j provoque des changements significatifs comparés aux témoins sur le plan de la croissance globale (poids corporel, gain de poids et poids relatif des reins) et sur le plan biochimique (taux de protéines et de lipides et de glucides) et sur le plan enzymatique (MDA, GPx et CAT).

Cependant, le taux des glucides a significativement augmenté avec l'administration de l'extrait. Cette augmentation peut être due à l'inhibition d'utilisation du glucose et du glycogène rénale pour satisfaire aux besoins énergétiques croissante (**El-Soud et al., 2011**) ont réalisé une étude sur l'effet de l'extrait sur le taux des glucides chez les souris. Ils ont trouvé que les petites doses de l'extrait exercent une augmentation du taux du glucose.

Partant du principe que tout type des contraintes environnementales (stress chimique, stress hydrique, thermique, oxydant, exposition à une pollution) peut provoquer une libération des radicaux libres dans l'organisme (Aurousseau, 2002), l'utilisation de l'extrait hydrométhanolique de l'écorce de grenade peut se montrer dangereuse aux doses fortes.

**Effet de la lambda cyhalothrine, la delthaméthrine et de l'extrait de *punica granatum* sur les paramètres de la croissance globale (poids corporel, gain de poids, et poids relatif au niveau rénal) au niveau rénal :**

Les résultats obtenus d'après notre étude de l'effet du traitement par l'extrait hydrométhanolique de l'écorce de grenade sur le poids corporels et le gain de poids des souris montrent qu'il y a une diminution significative, due probablement à la réduction de la consommation alimentaire au cours de l'expérimentation. Nos résultats sont en accord avec l'étude de Les auteurs ont déclaré que l'écorce de grenade réduit la perdre du poids corporels et du gain du poids (Kamal et al., 2012), et ces résultats obtenus aussi l'effet du traitement par les deux pesticides la deltamethrine et lambda cyhalothrine sur le poids corporels et le gain du poids des souris montrent qu'il y a une diminution significative du poids des souris .Cette diminution peut être traduite par la perturbation du métabolisme cellulaire sous l'effet du stress oxydatif (Kamal et al., 2012).

Notre résultats montrent qu'il y a une augmentation très hautement significative ( $P < 0,001$ ) du poids relatif des reins chez les lots traités par la DM, LCT.

**Effet de la lambda cyhalothrine, la delthaméthrine et de l'extrait de *punica granatum* sur les métabolites au niveau rénal :**

Notre étude consiste à évaluer l'effet de lambda cyhalothrine (LCT), deltaméthrine (DM) sur le métabolisme général de système rénal des souris, et probable effet opposé de l'extrait de *Punica granatum* L., observation des résultats rend compte d'une toxicité plus évidente de LCT et DM , puisque nous constatons une perturbation dans le taux des lipides, glucides et protéines, ces variations par rapport aux témoins vont dans le sens des nombreux travaux consacrés aux pesticides et qui mettent en évidence la perturbation de plusieurs systèmes enzymatiques à la fois selon les espèces (Khebbeb et al., 1997). Ils seraient à l'origine d'une perturbation du métabolisme lipidique les pesticides auront également des effets sur le poids et les protéines (Soltani-Mazouni et al., 1996). Mais l'intervention de l'extrais hydro-méthanolique de l'écorce de grenade signalent les teneurs en polyphénols qui assure un effet protecteur (Shiban et al, 2012), et rétabli les valeurs a la normal.

L'augmentation de taux des protéines nous confirmait les résultats trouvés sur les paramètres de stress oxydant notamment l'activité enzymatique (protéines de résistances). La dégradation cellulaire dans le système rénal engendre plusieurs anomalies notamment les maladies de la déficience rénale...etc., le taux élevé de glucide et le taux diminué des lipides nous confirme ce résultat.

### **Glutathion peroxydase :**

La glutathion peroxydase ou GPx est une enzyme tétramérique permettant également la décomposition du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Elle agit plus lentement que la catalase mais elle a une meilleure affinité pour le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que cette dernière. La GPx est donc essentielle à la décomposition du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produit de manière continue et à des niveaux physiologiques dans la cellule. Les GPx sont des enzymes sélénium-dépendantes ou sélénium-indépendantes et sont soit cytosoliques le cas de la première GPx identifiée (**Mills, 1957**), soit extracellulaires. Les GPxs permettent la décomposition de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par l'oxydation de son co-substrat le GSH en GSSG qui sera réduit par la suite par l'action de la glutathion réductase (**Mills, 1957**).

Selon l'étude de **Sharma et al, (2008)** qui ont étudié l'effet dépendant de la pérotherinoïde lambda-cyhalothrine et la deltaméthrine dans les testicules, le cerveau, le foie et le rein des souris Wistar, ils ont trouvé. Une augmentation d'activité de GPx après exposition à une dose de lambda cyhalothrine et deltaméthrine ce qui est similaire à nos résultats qui est une augmentation très hautement significative de taux de l'enzyme GPx par rapport aux témoins. Pendant que l'extrait hydro-méthanolique du grenade normalise les résultats par rapport à son effet thérapeutique par son teneur en polyphénol. (**Shiban et al, 2012**)

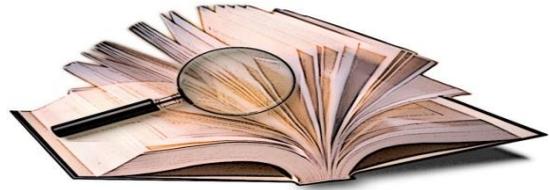
### **Catalase CAT :**

L'activité de la catalase augmente donc après un stress oxydatif pour protéger les cellules vivantes. En concordance avec nos résultats, (**Patra et al., 2001**) ont rapporté une élévation des teneur de la catalase chez des souris exposés aux pesticides. Contrairement à nos résultats, une diminution de l'activité de la catalase dans les reins des souris intoxiqués les pesticides a été rapportés par (**Sandhir et Gill 1995**). De même, (**Chaurasia et Kar 1997**) et (**Al-Amoudi, M.2016**) ont rapporté une diminution du taux de la catalase au niveau thyroïdal et rénal chez des souris intoxiqués par les pesticides. Ces auteurs n'ont pas rapporté d'explications possibles à ce résultat.

**Malondialdéhyde :**

Le MDA ou malondialdéhyde plasmatique est un marqueur de la peroxydation des lipides. Il est considéré comme un des produits terminaux de l'oxydation des acides gras polyinsaturés. Les taux élevés de MDA signent donc un stress oxydatif, portant notamment sur l'oxydation des lipides.

Nos résultats ont montré que 15 jours d'exposition à lambda cyhalothrine et deltamethrine ont augmentés hautement significative de teneur de (MDA) dans les reins, ce résultat s'accorde avec l'étude de (Li HY, et *al.*, 2005) qui ont travaillé sur Le stress oxydatif des pesticides sur le système rénale du rat. Nous pouvons estimer que ces pesticides ont un effet sur la formation de l'MDA et que l'action anti-oxydante de *Punica granatumL.*, dans l'extrait d'écorce du fruit qui présente des teneurs élevées en polyphénols agissent d'une manière néphroprotectrice et normalise ces effets toxiques.



---

# *Conclusion*

### Conclusion :

L'objectif de ce travail de recherche était d'explorer la toxicité induit par les deux pesticides lambda-cyhalothrine et deltaméthrine; au niveau rénal chez les souris *Mus musculus* de la souche BALB/C et de tester l'effet protecteur de l'extrait hydro-méthanolique de l'écorce de *Punica granatum* contre cette toxicité.

À travers le travail que nous avons abordé, on peut conclure que :

#### - L'administration des pesticides chez les souris, a engendré :

- ❖ Des perturbations au niveau de la croissance générale des souris :
  - Diminution du poids corporel durant la période de traitement.
  - Augmentation des poids absolus et relatifs des reins.
  - Variation de la consommation quotidienne d'aliment et de l'eau de boisson.
- ❖ Des perturbations au niveau de certains paramètres métaboliques :
  - Augmentation de taux des protéines au niveau des reins chez les souris.
  - Diminution de taux des glucides au niveau des reins chez les souris.
  - Diminution de taux des lipides au niveau des reins chez les souris.
- ❖ L'exposition continue aux pesticides génère un état de stress oxydant traduit par des perturbations au niveau de certains paramètres enzymatiques et non enzymatiques objectivé par :
  - Augmentation de teneur de glutathion peroxydase GPx au niveau des reins chez les souris.
  - Augmentation de teneur de catalase CAT au niveau des reins chez les souris.
  - Augmentation de teneur de malondialdéhyde MDA au niveau des reins chez les souris.

#### La supplémentation en l'extrait hydro-méthanolique de l'écorce de grenade chez des souris traitées par les pesticides, a provoqué :

- Une amélioration au niveau de poids relatif des reins.
- Une correction des taux des paramètres métaboliques (protéines, glucides, lipides)

## Conclusion

---

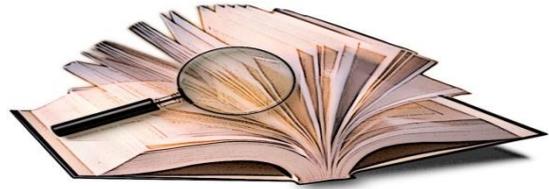
- Une amélioration du statut enzymatique antioxydant telles que la GPx et la CAT, et non enzymatique telle que MDA, au niveau rénal.

Ainsi, l'extrait de l'écorce de *Punica granatum* permet de limiter les perturbations provoquées par les pesticides. C'est l'extrait semblent avoir des effets bénéfiques, par une limitation des phénomènes radicalaires et une réparation des dommages oxydantes, ceci est expliqué par leur pouvoir antioxydant qui conduit donc à contracter l'état du stress oxydant.

### En perspectives :

Il s'avère intéressant d'approfondir cette étude par :

- ✓ La détermination de la concentration en pesticides au niveau des organes cibles notamment dans les organes de détoxification.
- ✓ La détermination des molécules bioactives responsable de l'effet protecteur notable des extraits des écorces de grenadier.



---

# *Références bibliographiques*

### A

- Adamou A., Abdoulaye A., Soumaïla M., Moussa I., Coly A., Tine A. &Ikhiri K.,( 2010).** Dégradation abiotique de la Deltaméthrine et de l'Etufenprox dans les eaux naturelles du Niger = Abioticdegradation of Deltamethrin and Etofenprox in Niger natural waters. *J. Soc. Ouest-Afr. Chim.*, **29**, 45–54.
- Agarwal A, K Makker, R Sharma** - American journal of reproductive immunology, (2008)  
Cité 690 fois Autres articles Les 20 versions
- Agric Food Chem J,(2009)** of different origins by HPLC-DAD-ESI-MS. 56: 3444-3453.
- AGRITOX. (2011).** "AGRITOX - Base de données sur les substances actives phytopharmaceutiques ",1-18 pp.
- Ajaikumar KB Et al.(2005).** The inhibition of astric mucosal injury by *Punicagranatum* L. (pomegranate) methanolic extract. *J Ethnopharmacol.* 4;96(1-2):171-6pp.
- Al-Amoudi, M.2016.**Protecteve effects of fennel oil extrect against sodium valproate-induced hepatorenal damage in albino rats. 24:915- 924pp.
- Albrecht M, Jiang W, Kumi-Diaka J, Lansky EP, Gommersall LM et Patel A.(2004).** Pomegranate extracts potently suppress proliferation, xenograft growth, and invasion of human prostate cancer cells. *J Med Food.* 2004 Fall;7(3):274-83pp.
- Ángel, (2010).** Antioxydant Naturel De La Grenade Propriétés Et Bienfaits Pour La Santé. Universidad Miguel Hernández,p71.
- Atamer A, Kocyigit Y, Ecared SA, Selek S, illhan N, Ecared T, Atamer Y. (2008).** Effect of oxydative stress on antioxydant enzyme activities, homocysteine and lipoproteins in chronic kindney disease 09 : 215-235pp.
- Aurousseau, B. (2002).** Les radicaux libres dans lorganisme des animaux : Conséquences sur la reproduction, la physiologie et la qualité de leurs produits. *INRA Prod. Anim.* 15(1),p. 67-82. Badji Mokhtar, Annaba. 74p.

### B

- Barr, D. B., Olsson, A. O., Wong, L. Y., Udunka, S., Baker, S. E., Whitehead, R. D., . . . Needham, L. L. (2010).** Urinary concentrations of metabolites of pyrethroid insecticides in the general U.S. population: National Health and Nutrition Examination Survey 1999-2002. *Environ Health Perspect*, *118*(6), 742-748 pp.
- Basu A, Penugonda K.(2009).** Pomegranate juice: a heart-healthy fruit juice. *Nutr Rev.*67(1):49-56pp.

## Références

---

**Baynes Re et Hodgson E .,(2010)-** Absorption and Distribution of Toxicants. Textbook of Modern Toxicology. Hoboken, New Jersey. (4):79-114 pp.

**Belkheiri N.(2010)** .Dérivés phénoliques à activité antiathérogènes .Thèse de 3ème cycle. université de Paul Sabatier. Toulouse, France, 244 p.

**BerrahAwatef. (2011)** : Etude sur les pesticides, Op.cit, P4.

**Bodereau-Dubois B., (2011).** Recepteurs nicotiniques neuronaux d'insectes et insecticides : caracterisation de facteurs cellulaires impliqués dans la modulation de l'efficacité des neonicotinoïdes. Thèse de Doctorat, spécialité : Biologie des Organismes. Université Angers. p195.

**Boland J., Koomen I., Lidth De Jeude J. V., Oudejans J., (2004)-AD29F** Les pesticides: composition, utilisation et risques. Ed. AgromisaFoundation, Wageningen. 86p.

**Boros, S. Jakabova, A. Domyei, G. Horvath, Z. Pluhar, F. Kilar, A. Felinger, (2010).** Determination of polyphenolic compounds by liquid chromatography-mass spectrometry in Thymus species. Journal of Chromatography A, , 1217: 7972-7980.

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

**Brenner, B. M. and F. C. Rector (2008).** Brenner & Rector's the kidney. Philadelphia, Saunders Elsevier 89p.

## C

**Calin Sanchez Angel et CarboneliBanaching 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 ontioxydantgranatum+ et université Miguel Hernandez (EDS), Murcia Espagne, 77p.

**Calvet R., Barriuso E., Bedos C., Benoit P., Charnay M.-P. et Coquet Y., (2005)-** Les pesticides dans le sol: conséquences agronomiques et environnementales. Ed. France Agricole Editions, France. 637p.

**Cazin F.J. (1868).** Traité pratique et raisonné des plantes médicinales indigènes et acclimatées. De l'envol (EDS) 1189 p.

**Championnière Just Lucas.(1850).** Journal de médecine et de chirurgie pratique: à l'usage des mediciens praticiens. Imprimerie de Crapelet (EDS), Paris, 21p.

**Chaurasia ,S., Kar ,A.(1997).**Protective effects of vitamin E against lead-induced deterioration of membrane associated type-I iodothyronine 5' -monodeiodinase (5' D-1) activity in male mice.3(31) :203-209 pp

## Références

---

**Comhair S.A.A., Erzurum S.C. (2002).** Antioxidant responses to oxidant-mediated lung diseases. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 283(2): 246-255pp.

**Cowan M. M. (1999).** Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews* : 564-582pp.

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

**Curtay, J.P., Jacob, L., Jung, R.R., & Kaplan, M. (2008).** Jus de grenade fermenté, la grenade, "aliment-plus" un nouvel outil puissamment cardiovasculaire et anti-cancer dans l'arsenal de la nutrithérapie. Macro pietteur (EDS), Paris, 73p

### D

**Delattre J, J.L Beaudoux , L, P. Therond, D. bonnefont- Rousselot, A. Legrand, J. Peynet.(2006).** Le stress oxydant, composante physiopathologique de l'athérosclérose.145-149 pp.

**Delattre J., Beaudoux J.L., Bonnefont-Rousselot D. (2005).** Radicaux libres et stress oxydant : aspects biologiques et pathologiques. Lavoisier édition TEC & DOC éditions médicales internationales, Paris. 405p.

**Deravel J., François K., Philippe J., (2014)** les biopesticides, compléments et alternatives aux produits phytosanitaires chimiques91p.

**Dickinson, H., D. W. Walker, L. Cullen-McEwen, E. M. Wintour and K. Moritz (2005).** "The spiny mouse (*Acomyscahirinus*) completes nephrogenesis before birth." *Am J Physiol Renal Physiol* 289(2): F273-279pp.

### E

**El-Habibi E.M., (2013).** Renoprotective effects of *Punicagranatum*(pomegranate) against adenine-induced chronic renal failure in male rats. *Life Science Journal*, vol 10, no 4,. 2059-2069 pp.

**El-SoudN., N. El-Laithy., G. El-Saeed .(2011).** "Antidiabetic activities of *Foeniculumvulgare*mill.Essential oil in streptozotocin-induced diabetic rats," *Macedonian Journal of Medical Sciences.*, 4( 2) : 139–146pp.

**Esmailzadeh A, Tahbaz F, Gaieni I, Alavi-Majd H, Azadbakht L.(2006).** Cholesterollowering effect of concentrated pomegranate juice consumption in type II diabetic patients with hyperlipidemia. *Int J Vitam NutrRes.* 2006 May;76(3):147-51pp.

### F

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

**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. *ExpToxicolPathol*, 61(3), 189-196 pp.

**Fusco D., Colloca G., Lo-Monaco MR., Cesari M. (2007).** Effects of antioxidant supplementation on the aging process. *ClinInterv Aging* 2(3):77-87pp.

### G

**Goor A. (1967).** The history of the pomegranate in the holy land. *EconomicBotany* 230.p

**Goudable J., Favier A. 1997.** Radicaux libres oxygénés et antioxydants. *Nutrition Clinique et Métabolisme*. 11 :115-120 pp.

**Gubernatis A. (1882).** La mythologie des plantes ou des légendes du règne végétal. Editeur C. Reinwald Paris. Tome II, 166-169pp.

**Guenzet A., (2012)-** Effets des extraits aqueux lyophilisés de *Portulacaoleracea* et *Zygophyllum gaetulum* sur le profil lipidique et le statut redox, chez des rats rendus diabétiques par injection de streptozotocine. MAG. Université d'Oran .P74.

### H

**Haleng ,J., Pincemail ,J., Defraigne, JO., Charlier C, Chapelle, JP. (2007).** Le stress oxydant. *Rev Med Liege.*, 62(10):628-638 pp.

**Haleng et al J. Haleng, J. Pincemail, J.O. Defraigne, C. Charlier, J.P. Chapelle .** Le stress oxydant.628-638 pp.

**Halliwell B. (1999).** Establishing the significance and optimal intake of dietary antioxidant: the biomarker concept. *Nutrition Reviews*. 57 : 104-113 pp.

**Halliwell B., Gutteridge J.M.C. (2007).** *Free Radicals in Biology and Medicine*. 4th edition.

**Heber D. (2006).** Preface. In : *Pomegranates Ancient Roots to Modern. Medicine* CRC Press Taylor & Francis Group Medicinal and aromatic plants–industrial profiles, 263p.

**Héla Toumi,(2013).** Ecotoxicité de la deltaméthrine et du malathion sur différentes souches de *Daphnia magna* (Crustacea,Cladocera): apport de la protéomique dans la recherche de nouvelles cibles cellulaires, L'université de Lorraine & l'université de Carthage.44 p.

**Hennebelle T., Sahpaz S. et Bailleul F. (2004).** Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Phytothérapie*, 1: 3-6pp.

## Références

---

**Hubbard J. C. et Clay H. F. (1977).** Punicaceae. In: Tropical exotics. Ed. University of Hawaii press. 125 p.

### I

**INSERM, (2013)-** (Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale) Pesticides: effets sur la santé. Ed. Les éditions Inserm, Paris. 1001p.

### J

**Jean B ., Malausa C, (2002)-** Pesticides et protection phytosanitaire dans une agriculture en mouvement, Ed . Editions Quae, Paris.976p.

**Jean- Noël Aubertot, Jean-Marc Barbier, Alain Carpentier, Jean Joël Gril, Laurence Guichard, Philippe Lucas, Sergz Savary, Marc Voltz., (2005)-** Pesticide, agriculture et environnement Réduire l'utilisation des pesticides et limiter les impacts environnementaux. Ed. Editions Quae, Paris. 134p.

**Jeroen Boland, IreneKoomen, Joep van Lidth de Jeude,Jan Oudejan,(2004).**Les pesticides :composition, utilisation et risques.23-56 pp.

**Johnson, L. R. and J. H. Byrne (2003).** Essential Medical Physiology, Academic Press.58p.

**Jones ,D., Mody ,V., Carlson , J. (2002).** Redox analysis of human plasma allows separation of pro-oxidant events of aging from decline in antioxidant defenses. Free Rad Biol Med .,33: 1290-1300 pp.

**Josiane Cillard ., Pierrre Cillard, (2006).** Mécanisme de la peroxydation lipidique et des anti- oxydations .24-28 pp.

**Afaq F,** Anthocyanin- andhydrolysabletannin-rich pomegranate fruit extract modulates MAPK and NF-kappaBpathwaysand inhibits skin tumorigenesis in CD-1 mice. Int J Cancer 2005 Jan 20;113(3):423-33pp.

### K

**Kamal, A., Khalid, S., et Hashem. (2012).** Le stress oxydatif induit par la deltaméthrine et les changements biochimiques dans les tissus et le sang du poisson-chat ( *Clariasgariepinus* ): défense antioxydante et rôle de l'alpha-tocophérol. BMC Vet Res. 10.1186 / 1746-6148-8-45

**Khebbeb, M.E.H., Delachambre, J. and Soltani, N., (1997).** Lipid metabolism during the sexual maturation of the mealworm (*Tenebrio molitor*): Effect of ingested Diflubenzuron. Pest. Biochem. Physiol. 58: 209-217pp.

## Références

---

**Kawaii Set al.**, Differentiation-promoting activity of pomegranate (*punicagranatum*) fruit extracts in HL-60 human promyelocytic leukaemia cells. *J Meed Food*. (2004) Spring;7(1):13-8pp.

**Khedoudja,(2014)** Khedoudja KANOUN, Bouziane ABBOUNI, Mohamed Lamine BENIGNE et al. Etude de l'efficacité de l'extrait éthanolique d'écorce de *PunicaGranatum* Linn sur deux souches phytopathogènes : *AscochytaRabiei* (Pass.) Labr. Et *FusariumOxysporum*F.sp.*Radiciis* –*Lycopersici*. [en ligne]. *European Scientific Journal* April 2014 édition vol.10,No.12, p 1-15.

**Kinsky N .**(1989). Antioxydants function of carotenoides. *Free Rad Biol Med* 7 : 617–620pp.

**Krinsky, N.I., (1989)**. Antioxidant functions of carotenoids. *Free RadicBiol Med* 7, 617-635pp.

### L

**Lacarelle B Et Viala A.,(2005)**-Manifestations de l'action des toxiques au niveau rénal. *Toxicologie*. (2):173-177pp.

**Lansky E. et Newman R. (2007)**. *Punicagranatum*(pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. *Journal of Ethnopharmacology*.109: 177–206pp.

**Lecerf ,J.M., Luc ,G., Fruchart, J.C. (1994)**. Vitamine E, antioxydants et athérosclérose, *Rev. Mid. Interne* .,15 : 641-649 pp.

**Leopoldini, N. Russo, M. Toscano ,(2011)** ,The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants *Food Chemistry*, 288-306 pp.

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

**Li ,H.Y ., Shi, N ., Chen ,D ., Dai, Z.H ., Lu ,W.H., Wang, B ., Li ,Y.R., (2005)**. Le stress oxydatif de la deltaméthrine sur le système nerveux du rat. *Zhonghua Lao Dong Wei Sheng Zhi Ye Bing ZaZhi*. 23 (2): 97-101

**Little, M. H. and A. P. McMahon (2012)**. "Mammalian kidney development: principles, progress, and projections." *Cold Spring HarbPerspectBiol*4 (5).

### M

**Macheix JJ., Fleuriet A., Chritian JA. (2006)**. Composés phénoliques dans la plante-structure, biosynthèse, répartition et rôles In « les polyphénols en agroalimentaire ». Édition Lavoisier : 1-27pp.

## Références

---

- Macheix, J.J., Fleuriet, A. et Jay-Allemand, C. (2005).** Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Ed Presses polytechnologiques et universitaires romandes, 345 :4-5pp.
- Malik A, Afaq F, Sarfaraz S, Adhami VM, Syed DN, Mukhtar H.(2005).** Pomegranate fruit juice for chemoprevention and chemotherapy of prostate cancer. Proc Natl AcadSci U S A. 11;102(41):14813-8.
- Martin S etAndriantsitohaina R. (2002).** Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. *Annales de cardiologie et d'angiologie* **51**, 304-315pp.
- Martinez, J.J., Hernandez, F., Haddioui A., Legua, P., Martinez R., Ajal, A., Melgarejo, P., (2012).** Physico-chemical characterization of six pomegranate cultivars from Morocco: Processing and fresh market aptitudes. Sci. Hortic, 140, 100-106.
- Meftah Tewfik (2003) Mr MEFTAH Tewfik (2003) Cosmétologie au naturel cosmétologie au naturel 12 p.**
- Mehmet A., Oturan et Jean-Marie Mouchel-** Pesticides Impacts environnementaux, gestion et traitements, Ed. Editions Quae, Paris.333p.
- Melgarejo M. P., Martinez V. R., (1992).** El granado. Ed. Mundi-Prensa, Madrid**Agric Food Chem J,(2009)** of different origins by HPLC-DAD-ESI-MS. 56: 3444-3453.
- Merhi M., (2008)-** Etude de l'impact de l'exposition à des mélanges de pesticides à faibles doses: caractérisation des effets sur des lignées cellulaires humaines et sur le système hématopoïétique murin. Thèse doctorat Pathologie, Toxicologie, Génétique et Nutrition. Toulouse. Université De Toulouse. 249p.
- Mills, G.C., (1957).** Hemoglobin catabolism. I. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. J BiolChem 229, 189-197.
- Mohammedi ,Z. (2005).** Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemcen. Mémoire de magister- Université Abou BakrBelkiid Tlemcen. 24p.
- Morton J. (1987).** Pomegranate. In: Fruits of warm climates. Miami, Florida. 352–355 pp.
- Muanda F N., (2010)-**Identification de poly phénols, évaluation de leur activité antioxydante et étude de leurs propriétés biologiques. Doc. Ecoledoctorale SESAMES.P239.
- Murphy KN.(2004).** Study on wound healing activity of Punicagranatum peel. J Med Food. 2004 Summer;7(2):256-9.

### O

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

**Oros DR, Werner I. (2005).** Pyrethroid Insecticides An Analysis of Use Patterns, Distributions, Potential Toxicity and Fate in the Sacramento-San Joaquin Delta and Central Valley. Thèse de doctorat, Université de Californie,P 24.

**Orsini P., Bonhomme F., Britton-Davidian J., Gerasimov S.(1989).** Le complexe d'espèces du genre *Mus* en Europe Centrale et Orientale : Critères d'identification, répartition et caractéristiques écologiques. P : 86-88.

### P

**Pantuck AJ, Leppert JT, Zomorodian N, Aronson W, Hong J et Barnard RJ. (2006).** Phase II study of pomegranate juice for men with rising prostate-specific antigen following surgery or radiation for prostate cancer. *Clin Cancer Res.* 2006 Jul 1;12(13):4018-26.

**Pasquier C. (1995).** Stress oxydatif et inflammation. *Revue française des Laboratoires.* 276: 87 – 92pp.

**Patra .,Swarup, D ., Dwivedi, K.(2001).**Antioxidant effects of  $\alpha$ -tocopherol ,ascorbic acid and L methionine on lead induced oxidative stress to the liver,kidney and brain in rats. 81-88pp.

**Pimentel D., (2002)-** Encyclopedia of Pest Management. Ed. CRC Press, France. 931p.

**Pincemail J., Bonjean K., Cayeux K. &Defraigne J.O. (2008).** Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante. *Nutrition clinique et métabolisme.* 16 : 233 – 239 pp.

**Powers, S.K., Jackson, M.J., (2008).** Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiol Rev* 88, 1243-1276 pp.

**Prashanth D et Asha M.K.(2001).** Antibacterial activity of *Punicagranatum*. *Fitoterapia.* 2001. N°72. Pages 171-173.

### Q

**Quezel P., Santa s., (1963).** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Edition : Centre National de la Recherche Scientifique. Paris 7. 1170p

### R

**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., 19-25 pp.

## Références

---

- Reddy TK, Jagetia GC, Venkatesha VA, Naringin, (2003)** a citrus flavonone, protects against radiation-induced chromosome damage in mouse bone marrow. *Mutagenesis* 18(4): 337–343pp.
- Reichl Fx., (2004)** -Guide pratique de toxicologie. 2 eme Ed. *DeBoeck et Larcier* Bruxelles. 16p.
- Rhee G., Kang W., Jeong W., Chang S., Yang S. (2005)**. Intracellular messenger function of hydrogen peroxide and its regulation by peroxiredoxins. *Curr Opin Cell Biol.* 17: 183-189pp.
- Rhiouani H., El-Hilaly J., Israili Zh., Et Lyoussi B .,(2008)**- Acute and subchronic toxicity of an aqueous extract of the leaves of *Herniariaglabrain* rodents. *Journal of Ethnopharmacology.* (118): 378-386pp.
- Rodeck, C. H. and M. J. Whittle (2009)**. *Fetal Medicine: Basic Science and Clinical Practice*, Churchill Livingstone.
- Rosenblat M, Hayek T, Aviram M.(2006)**. Anti-oxidative effects of pomegranate juice (PJ) consumption by diabetic patients on serum and on macrophages. *Atherosclerosis.* (2006) Aug;187(2):363-71pp.
- Rouhier N., Gelhaye E., Sautiere P., Brun A., Laurent P., Tagu D., Gerard J. (2001)**. Isolation and characterization of a new peroxiredoxin from poplar sieve tubes that uses either glutaredoxin or thioredoxin as a proton donor. *Plant Physiol.* 127: 1299-1309pp.
- S**
- SamiranMondal Mate MS Ghosh RC Karmakar DB (2010)** effect of lambda cyhalothrin on rats. An acute toxicity study *West of Animal and Fishery Sorensen*, January (2010) 509p.
- Sandhir, R .Gill. (1995)**. "Effect of lead on lipid peroxidation in liver of rats" (48 ):91p
- Sarkhosh, A., Zamani. Z., Fatahi, R., Ebadi, A., (2006)**. RAPD markers reveal polymorphism among some Iranian pomegranate (*Punicagranatum L.*) genotypes. *Sci. Hortic,* 111(1), 24-29pp.
- Sayeed I., Parvez S., Pandey S., Bin-Hafeez B., Haque R. & Raisuddin S., (2003)**. Oxidativ stress biomarkers of exposure to deltamethrin in freshwater fish, *Channa punctatus* Bloch. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **56**, 295–301pp.
- Schubert SY, Lansky EP, Neeman I. (1999)**. Antioxidant and eicosanoid enzyme inhibition properties of pomegranate seed oil and fermented juice flavonoids. *J Ethnopharmacol;* 66(1):11-7pp.

**Seeram NP, Lee R, Heber D.(2004).** Bioavailability of ellagic acid in human plasma after consumption of ellagitannins from pomegranate (*Punicagranatum L.*) juice. *ClinChim Acta*;348(1-2):63-8pp.

**Sharma R, A Agarwal, K Makker-** American journal of reproductive immunology, (2008) Cité 690 foisAutres articles Les 20 versions.

**Shiban M.S., Al-Otaibi M.M., Al-Zoreky N.S., (2012).** Antioxidant activity of pomegranate (*Punicagranatum L.*) fruit peels. *Food and Nutrition Sciences*, (3): 991-996pp.

**Shukla Y., Arora A. & Singh A., (2001).** Tumourigenic studies on deltamethrin in Swiss albino mice. *Toxicology*, **163**, 1–9pp.

**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.

### T

**Tarloff Jb et Wallace Ad., (2010)-**Nephrotoxicity: A Textbook of ModerToxicology.Hoboken, New Jersey. (4): 291-302pp.

**Thomas S.R., Chen K. &Keaney J.F. (2003).** Oxidative stress and endothelial nitric oxide bioactivity Antioxyd Redox Signal. Mary Ann libertpublishers, 5 (2):94-181pp .

**Toumi H., (2013).** Ecotoxicité de la deltaméthrine et du malathion sur différentes souches de *Daphnia magna*. Thèse de Doctorat en cotutelle entre l'université de Lorraine et l'université de Carthage. 208p.

**Traber, MG ., Atkinson, J. (2007).**Vitamin E, antioxidant and nothing more. *Free Radical Biology Medicine.*, 43: 4–15 pp.

### V

**Velmurugan B, Selvanayagam M, Cengiz EI, Unlu E. (2007).** Histopathology of lambda-cyhalothrin on tissues (gill, kidney, liver and intestine) of *Cirrhinusmrigala*. *EnvironmentalToxicology and Pharmacology*, **24**: 286-291pp.

**Vincent C., Panneton B., Fleurat-Lessard F., (2000)-** La lutte physique en phytoprotection. Ed. Editions Quae, Paris. 347p.

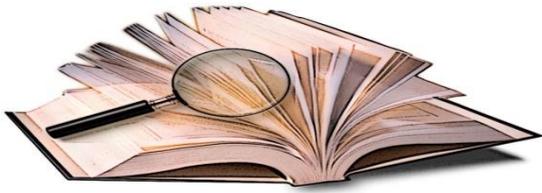
### Z

**Zelko I.N., Mariani T.J., Folz R.J. (2002).**Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the Cu/Zn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Rad. Biol. Med.* 33(3): 337-345pp.

## Références

---

**Zielinski and Portner, (2000).** Oxidative stress and antioxidative defense in cephalopods: à function of metabolic rate or age? *Comp BiochemPhysiol B BiochemMolBiol* 125, 147pp.



---

# *Annexes*

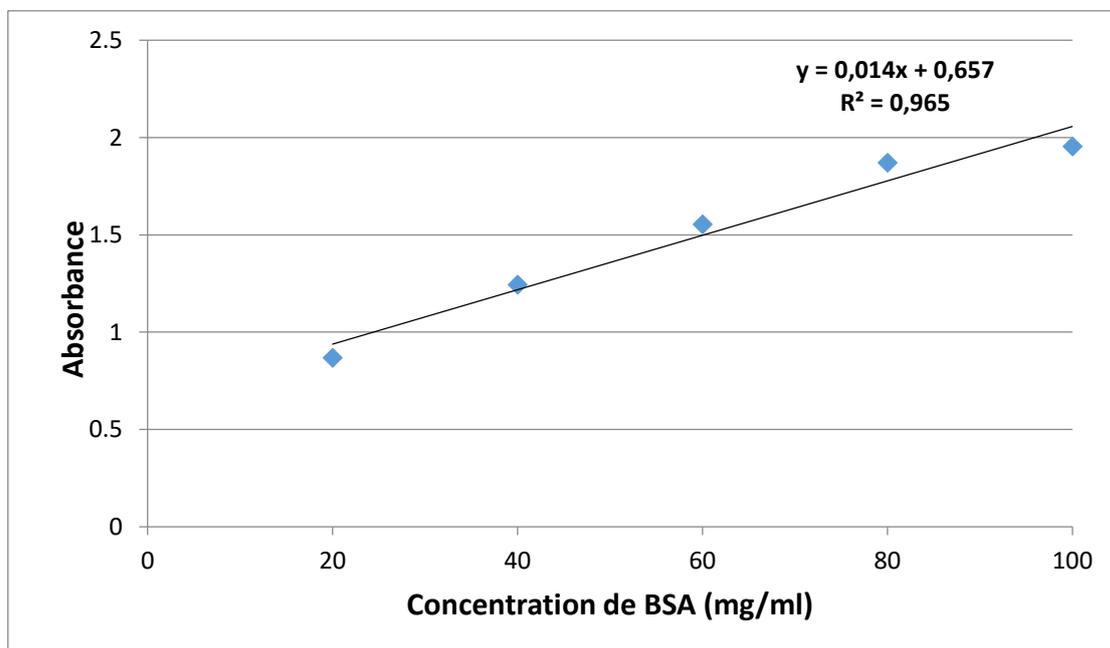
### Annexe 01 : Dosage des protéines.

La réalisation de la gamme d'étalonnage pour dosage des protéines aux niveaux des reins.

<b>Tubes</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>
<b>BSA (µl)</b>	00	20	40	60	80	100
<b>Eau distillée (µl)</b>	100	80	60	40	20	00
<b>Réactif BBC (ml)</b>	4	4	4	4	4	4

Dosage des protéines : résultats des densités optiques de la gamme d'étalonnage.

<b>Concentration de BSA</b>	<b>20</b>	<b>40</b>	<b>60</b>	<b>80</b>	<b>100</b>
<b>Absorbance(DO)</b>	0,868	1,243	1,553	1,871	1,954



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

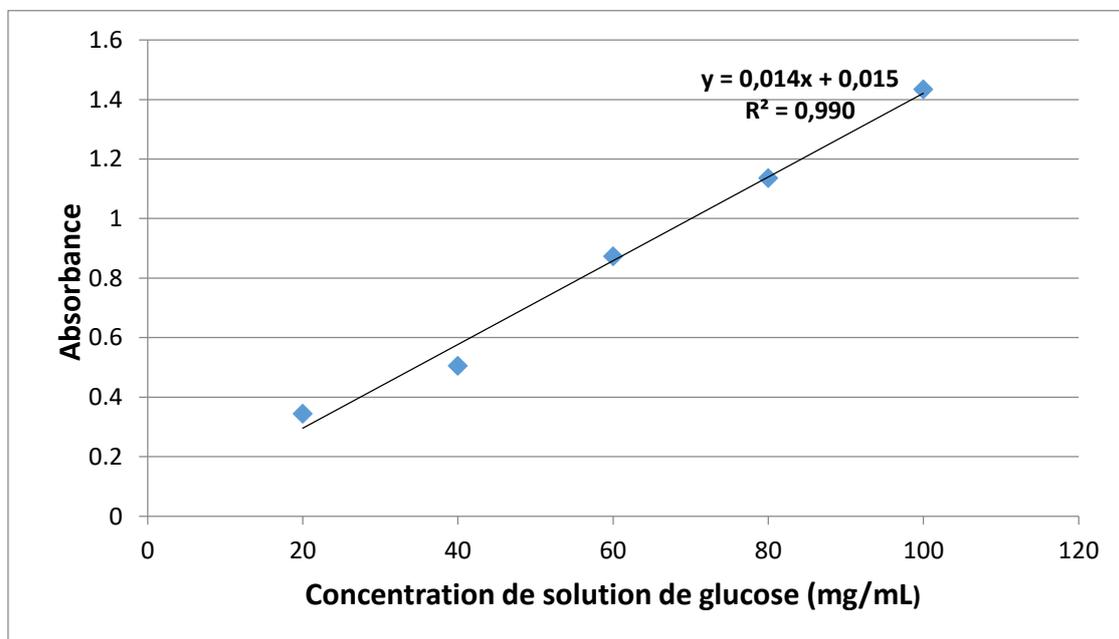
### Annexe 02: Dosage des glucides.

La réalisation de la gamme d'étalonnage pour les glucides aux niveaux des reins

Tubes	1	2	3	4	5	6
Solution mère de glucose (µl)	00	20	40	60	80	100
Eau distillée (µl)	100	80	60	40	20	00
Réactif d'Anthrone (ml)	4	4	4	4	4	4

Dosage des glucides : résultats des densités optiques de la gamme d'étalonnage.

Concentration de solution glucose (mg/ml)		20	40	60	80	100
Absorbance (DO)		0,344	0,505	0,873	1,136	1,434



Droite de régression exprimant les absorbances à 620 nm en fonction de concentration de solution de glucose (mg/ml) ( $R^2$ : coefficient de détermination).

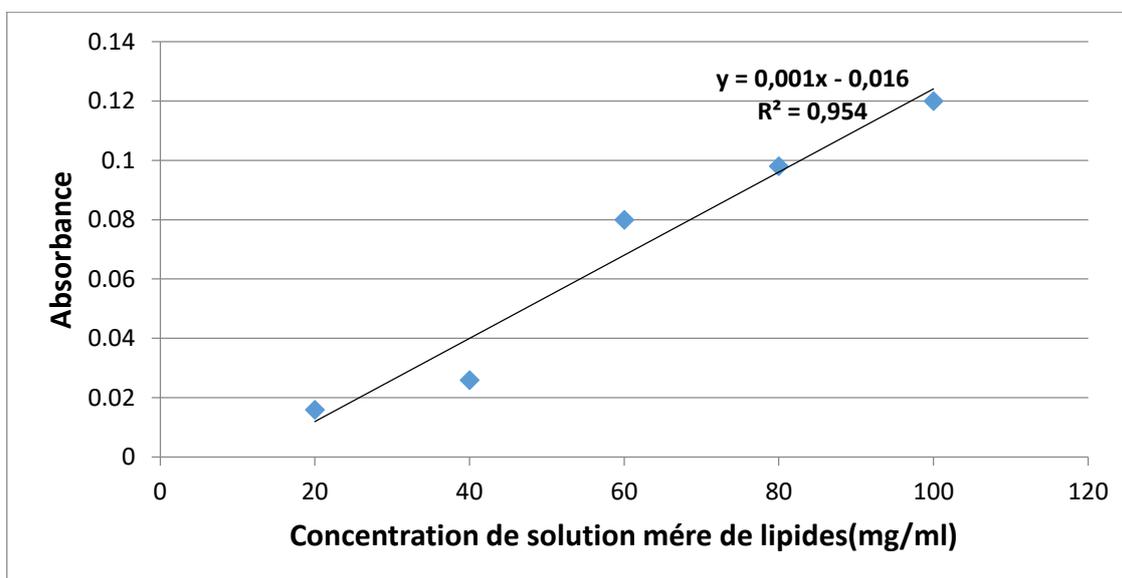
### Annexe 03 : Dosage des lipides.

La réalisation de la gamme d'étalonnage pour les lipides aux niveaux des reins.

Tubes	1	2	3	4	5	6
Solution mère de lipide (µl)	00	20	40	60	80	100
Solvant (éther /chloroforme) (1V/1V) ml	100	80	60	40	20	00
Vanilline (ml)	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5

Dosage des lipides : résultats des densités optiques de la gamme d'étalonnage.

Concentration de solution de lipides (mg/ml)	20	40	60	80	100
Absorbance (DO)	0,016	0,026	0,08	0,098	0,12



Droite de régression exprimant les absorbances à 530 nm en fonction de concentration de solution mère de lipides (mg/ml) ( $R^2$ : coefficient de détermination).

## Annexe 04 : Matériels et Appareils utilisée :

-Centrifugeuse (SELECTA)	
-Balance de précision (KERN)	- Etuve (HERAEUS)
-Agitateur magnétique (WITEG)	- Centrifugeuse (SELECTA)
-Réfrigérateur	-Tubes à essai
-Bain marie (MEMMERT)	-Tubes secs en verre et en plastique
-Agitateur Vortex (THERMOS)	-Spectrophotomètre (UV mini 1240, SHIMADZU)
-Balance analytique	-Cuves pour la spectrophotométrie
-Mortier + Pilon (Broyeur manuel)	-Papier d'aluminium
-Pissette	-Verre de montre
-Spatule	-Micropipettes (10µl à 5000µl)
-Portoirs	-Eprouvettes graduées
-Entonnoirs	-Erlenmeyers
-Becher	-Papier d'aluminium
-Papier absorbant	

## Annexe 05 : Matériels chimiques

-Acide sulfurique	-NaOH
-GSH	-BSA (Albumine sérum de boeuf)
-H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	-CDNB
-Acide orthophosphorique (à 85 %)	-Eau distillée
-HCl	-Tris
-BBC (Bleu Brillant de Coomassie)	
-NaCl	
- TCA (Trichloro acétique)	
-BHT (Butylhydroxytoluène)	-
-Méthanol absolu	

### Annexe 06 : Matériels de dissection et de décapitation

-Ciseaux	-gants de ménage
- Epingles	-Planche de dissection
-Papier absorbant	-Lames de rechange pour Scalpel
-Couteaux	-Papier aluminium
- Pince	-Scalpel
-Pavettes	-Balance de précision (PHILIPS précision)
-Aiguille droit	
- Boîtes	

### Annexe 07 : Préparation des solutions

#### Le protocole de préparation des solutions

#### Pour le dosage de MDA présenté dans le tableau

Solution TBS	0,878g de Nacl dans 100ml eau distillé on ajout 0,605g Tris
Solution TCA-BHT	20g TCA dans 100ml eau distillé puis en met 1g BHT dans un bécher en complète jusqu'a 100 ml avec le mélange (TCA- Eau distillé)
Solution Hcl	5,156ml Hcl en complète jusqu'à 100ml avec l'eau distillé
Solution Tris-TBA	0,32g Tris dans 100ml eau distillé puis en met 1,73g TBA dans un bécher en complète jusqu'a100ml avec le mélange (Tris-Eau distillé)

**Pour le dosage de CAT présenté dans le tableau**

Tampon Phosphate( TP )(PH7,4)	Solution A : 3,12g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> dans 100ml eau distillé. Solution B : 7,16g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> dans 100ml eau distillé. Mélanger :16 ml de (A) avec 84ml de(B).
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1,3ml H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> dans 98 ,7 ml eau distillé.

**Pour le dosage de GPx présenté dans le tableau**

Solution GSH(0,1mM)	3,76mg GSH dans 100ml eau distillé
Solution TCA(1%)	1g TCA dans 100ml eau distillé
Solution DTNB(1mM)	20mg DTNB 50ml méthanol absolu
Solution TBS	200 mg Tris dans 400 ml eau distillé
Solution tampon phosphate TP( PH7,4)	Solution A : 3,12g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> dans 100ml eau distillé. Solution B : 7,16g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> dans 100ml eau distillé. Mélanger :16 ml de (A) avec 84ml de( B).
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	36 µl H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> dans 100ml eau distillé

**Pour le dosage de protéine présenté dans le tableau**

<b>Solution BBC</b>	33,33 mg de BBC dans 16,67 ml éthanol .agitation pendant deux heures en ajoute 33,33 ml d'acide orthophosphorique en ajoute 333,33ml eau distillé
Ether chloroforme	Préparé dans laboratoire de biologie

**Pour le dosage de glucide présenté dans le tableau 18**

## Annexes

---

Anthrone	préparé dans laboratoire de biologie
----------	--------------------------------------

### **Pour le dosage de lipide présenté dans le tableau**

Acide sulfurique	dans laboratoire
Sulfo-phospho-vanillinique	préparé dans laboratoire de biologie