



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

MEMOIRE DE MASTER

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière: Sciences Biologiques

Option : Pharmacotoxicologie

Thème :

**Effets toxiques de deux pesticides
(deltamethrine et lambda cyhalothrine) sur
le système hépatique des souris, activité
protectrice de grenadine**

Elaboré par :

AIDHEL Louazna

MAMOUR Zakia

Devant le jury :

Mr. DJABRI Belgacem	Pr.	Université de Tébessa	Président
Dr. MENACEUR Fouad	MCA	Université de Tébessa	Promoteur
Dr. SOLTANI Nadjmeeddine	MAA	Université de Tébessa	Examineur

Date de soutenance : 18/06/2019

Note :.....

Mention :.....

Résumé

L'objectif de cette étude était de mettre en évidence les relations entre l'intoxication hépatique par deux pesticides pyréthrinoides et l'effet protecteur de *Punica granatum* L. 1753. Dans cette étude, nous avons utilisé deux pesticides ; lambda cyhalothrine et deltaméthrine, la *Punica granatum* seuls ou en mixture à des doses consécutives de 3,8 mg/kg/j pour le lambda cyhalothrine, de 50 mg/kg/j pour le deltaméthrine et de 50 mg/kg/j pour la *Punica granatum*, administrées sub-chroniquement par voie orale pendant 15 jours. L'étude est réalisée sur les souris de *Mus musculus* au nombre de 32 âgés de 2 à 3 semaines, le poids moyen 38 mg. Les souris ont été divisées en huit groupes à l'ordre de 04 individus par groupe. Le premier lot a servi comme témoin et reçu l'eau distillée. Les autres groupes ont été traités par les pesticides et la *Punica granatum* seul ou en mixture. Nos résultats ont montré que l'exposition aux deux pesticides a induit des changements dans les paramètres biochimiques et enzymatiques avec une diminution du taux de protéines et de l'activité de catalase (CAT) contre une augmentation de l'activité enzymatique de GPx et de MDA qui est un biomarqueur de peroxydation lipidique. Le traitement des souris avec de la *Punica granatum* a fait face contre la toxicité causée par le lambda cyhalothrine et le deltaméthrine, seul ou combinés, par sa capacité de piéger les radicaux libres et réduire les effets toxiques qui les induits.

Mots clés : Hépatotoxicité, pesticides, *Punica granatum*, deltaméthrine, Lambda cyhalotrin, les souris.

Abstract

The objective of this study is to highlight the relationship between hepatic poisoning by pesticides and the protective effect of *Punica granatum* L1753. For the realization of this study, we used two pesticides, lambda cyhalothrin and deltamethrin, *Punica granatum* alone or as a mixture at consecutive dose of 3.8 mg / kg / day for lambda cyhalothrin, 50 mg / kg/day for deltamethrin and 50 mg/kg/day for *Punica granatum*, administered sub chronically orally for 15 days. The study is carried out on *Mus musculusculus* mice of strain BALB / C, 32 of which are 2 to 3 weeks old, with an average weight of 38 g. The mice are divided into eight groups on the order of 04 individuals per group. The first batch served as a control and received distilled water. The other groups were treated with pesticides and *Punica granatum* alone or as a mixture. The results obtained at the end of our experiment showed that the pesticide treatment induced changes in the biochemical and enzymatic parameters with a decrease in the level of protein concentration in the batch treated by the mixture of the two pesticides. Catalase activity (CAT) experienced a significant decrease against an increase in the enzyme activity of GPx and MDA which is a biomarker of lipid peroxidation. The treatment of mice with *Punica granatum* has faced the toxicity caused by lambda cyhalothrin and deltamethrin, alone or in combination, by its ability to trap free radicals and reduce the toxic effects that induce them.

Key words: Hepatotoxicity, pesticides, *Punica granatum*, deltamethrin, Lambda cyhalothrin, mice.

ملخص

الهدف من هذه الدراسة هو تسليط الضوء على العلاقة بين التسمم الكبدي بالمبيدات الحشرية وتأثير وقائي من مستخلص قشرة الرمان. لتحقيق هذه الدراسة، استخدمنا اثنين من المبيدات الحشرية. لمبدا سيالوترين و الديلتاميثرين، و مستخلص قشرة الرمان فقط أو كمزيج بجرعات متتالية قدرها 3.8 ملغ / كغ / يوم بالنسبة لامبدا سيالوترين، 50 ملغ / كغ / يوم للديلتاميثرين و 50 ملغ / كغ / يوم مستخلص قشرة الرمان تعطى عن طريق الفم لمدة 15 يوما. أجريت الدراسة على فئران *Mus musculus* من الفصيلة BALB / C، 32 منها من عمر 2 إلى 3 أسابيع، بوزن متوسط 38 (ملغ). وتنقسم الفئران إلى ثماني مجموعات تتكون كل مجموعة من 4 فئران. استعملت المجموعة الأولى كشاهد تم علاجها بالماء المقطر فقط. وقد تم علاج المجموعات الأخرى بالمبيدات الحشرية ومستخلص قشرة الرمان فقط أو كخليط. أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها في نهاية تجربتنا أن معالجة مبيدات الآفات تسببت في تغيرات في المعايير الكيميائية والانزيمية مع انخفاض في مستوى تركيز البروتين في المجموعة التي عولجت بمزيج المبيدات اثنين. شهد نشاط (CAT) Catalase انخفاضا كبيرا مقابل زيادة في نشاط إنزيم (GPx (glutathion peroxydas و MDA الذي يعد علامة بيولوجية لبيروكسيد الدهون. واجهت معالجة الفئران مع مستخلص قشرة الرمان السمية الناجمة عن لامبدا سيالوترين وديلتاميثرين ، بمفرده أو معًا ، من خلال قدرته على حبس الجذور الحرة وتقليل الآثار السامة التي تحفزها.

الكلمات المفتاحية: التسمم الكبدي، المبيدات الحشرية، الديلتاميثرين، مستخلص قشرة الرمان و لامبدا سيالوترين ، الفئران.

Remerciements

Je tiens à exprimer d'abord mes profonds remerciements à mon **DIEU**, Le Tout
Puissant et

Le Miséricordieux, de m'avoir donné la santé, la volonté, la patience et le
courage pour mener à terme ce travail.

Mes sincères remerciements et ma profonde gratitude

Monsieur le **Docteur MENACEUR Fouad**, pour avoir accepté de diriger la réalisation
de cette thèse, pour avoir cru en moi. Je ne pourrai jamais lui exprimer assez toute ma
reconnaissance pour son aide, ces conseils et sa disponibilité.

À ma Présidente du jury

Docteur **DJABRI Belgacem**, merci de me faire l'honneur de présider la soutenance de
cette thèse et de juger ce travail, pour m'avoir transmis votre savoir et pour
l'expérience que vous m'avez apportée. Je vous prie de trouver ici l'expression de mon
profond respect et de mon entière reconnaissance.

À mon examinateur, Monsieur le Docteur **SOLTANI Nedjmeddine**, pour m'avoir fait
l'honneur d'accepter de juger ce travail, je vous en remercie sincèrement. Veuillez
trouver ici l'expression de mon profond respect et de toute ma considération.

A Monsieur **Salim GASMI** et Monsieur **BEN AICHA Ibrahim** pour son soutien et ses
précieuses conseils ainsi que son accompagnement durant toute la période de
réalisation de cette thèse.

A Madame **BEN ZAIM Karima**, veuillez recevez mes sincères remerciements pour
votre collaboration, aide constante, gentillesse et votre accueil chaleureux dans le
laboratoire ainsi que votre disponibilité pour nous. Soyez assuré de toute mon estime
et de mon profond respect.

******AIDHEL Louazna******

Dédicace

Afin d'être reconnaissant envers ceux qui m'ont appuyé et encouragé à effectuer ce travail de recherche, je dédie ce mémoire :

*À mon très cher Baba **Mohammed** pour son soutien moral, et pour tous les sentiments d'affection et d'amour qui représentent pour moi le pilier de tous mes efforts.*

À ma très chère mère et qui n'ont cessé de me combler par leur amour et leur tendresse.

*A mes chers frères (Zoubir, Zakaria, Djammel addine, Hamza, Saad) Et femme de frère **Khalida** pour leurs encouragements.*

*A mes fidèle amies: **Khoula GANUZ, Zakia, Halima, Hiba.***

*A mes **DOCTOR Salim GASMI et Ibrahim BENAICHA***

...pour leurs encouragements.

À tous les membres de ma famille sans aucune exception. Et à tous ceux que ma réussite leur tient à cœur.

***** AID HEL louazna*****

Remerciement

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

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

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

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

Un grand merci pour mon binôme AIDHEL **Louazna**.

*******MAMOUR Zakia*******

DEDICACE

Give my best fruit to the parents To my dear mother who supported me and did not spare me to pray To my beloved father who stood beside me and gave me all the support and support To my brothers (dr khalifa,hasouni,nawri,abd nacer;sami)and sisters(Halima;hayet,malika), may Allah preserve and care for them and according to them To all the friends who supported me in my special activities my sister Khawla,Halima and Halima Brahmi, Yousfi Jamila, Hamzah Najwa, AIDHEL Louazna, Nasira Jalab, adjal lamia, Here's a thousand greetings To my brothers and friends Professors: Halim Ben Farhat, Ben KHTHIR Karim, Gasmi Salim, and my friend louazna , Ben Aicha Ibrahim, Hisham Saker Which did not spare us, whether knowledge or support and support Thank you very much And a thousand thanks to the Faculty of Natural Sciences and Life.

****** MAMOUR Zakia******

LISTE DES FIGURES

N°	Titre de figures	Page
1	Structure chimique de la Deltaméthrine	05
2	Structure chimique de la lambda cyhalothrine	07
3	Mécanismes de transferts et de transformations des pesticides dans les milieux de l'environnement	09
4	Modes d'exposition de l'homme et des milieux par les pesticides	10
5	Foie de la souris	12
6	Balance d'équilibre entre les systèmes pro et antioxydants	14
7	Résumé des sources exogènes et endogènes de radicaux libre	16
8	Schéma des différentes formes des ROS.	18
9	Stress oxydatif et ses conséquences.	19
10	Schéma des défenses antioxydants enzymatiques.	21
11	Efficacité des divers antioxydants dans le corps humain en neutralisant les radicaux libres.	23
12	Différentes parties du grenadien	25
13	Souris (BALB/C)	30
14	Procédure d'extraction à partir de <i>Punicagranatum L. 1753</i>	31
15	Conditions d'élevage des souris	32
16	Traitement des souris	34
17	Mesure de poids par la balance numérique	34
18	Schéma récapitulatif la première parti de protocole expérimental	35
19	Schéma récapitulatif deuxième parti de protocole expérimental.	36
20	Foie de la souris	36
21	Poids initialdes souris au début de traitement et le poids final à la fin de traitement.	44

22	Evolution du gain de poids corporel (GP) chez les souris témoins et traités après 15 jours de traitement par les pesticides et <i>Punica granatu L.1753</i> .	45
23	Evolution du poids relatif du foie (PRf) chez les animaux après 15 jours de traitement par les pesticides et la <i>Punica granatum</i> .	46
24	Variation de teneur en protéines (mg) du foie chez les souris traitées durant 15 jours de traitement.	47
25	Variation de teneur en lipides (mg) du foie chez les souris traités durant 15 jours de traitement.	48
26	Variation de teneur en glucides (mg) du foie chez les souris traités durant 15 jours de traitement.	49
27	Taux de GPx (nmol/min/mg) chez les souris traités durant 15 jours par les pesticides et la <i>Punica granatum</i> .	50
28	Taux de MDA ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protéine) chez les souris traités durant 15 jours par les pesticides et la <i>Punica granatum</i> .	51
29	Taux de CAT (nmol/min/mg) chez les souris traités durant 15 jours par les pesticides et la <i>punica granatum</i> .	52

LISTE DES TABLEAU

N°	Titre de tableaux	Page
1	Classification des pesticides selon les organismes ciblés	03
2	Structure chimique formules brutes mode d'action et de quelque substance actives pesticides appartenant à déferents famille chimique	04
3	Nomenclatures de la <i>Punicagranatum.L1753</i>	24
4	Classification de <i>PunicagranatumL.1753</i>	25
5	Propriétés pharmacologiques des différentes parties du grenadier.	27
6	Doses létales de la <i>Punicagranatum L</i> chez les rats et les souris	28
7	Composée phénolique de <i>PunicagranatumL.1753</i>	29
8	Classification des souris	30
9	Différents pesticides utilisés	32
10	Protocolde dosage GPX	37
11	Solution l'activité catalase CAT	37
12	Solutions pour le dosage MDA	38
13	Solution de dosage pour le Protéine	38
14	Préparation des solutions pour les lipides	39
15	Préparation des solutions pour les glucides.	39

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN	Acidedésoxyribonucléique
ALAT	Alanine aminotransférase
ALKP	Phosphate Alcaline
ASAT	Aspartateaménotrensféraser
BBC	Bleu brillant de coomassie
BHT	Butyl hydroxy toluene
BPV	Boite pétrie vide
BPE	Boite pétrie d'extrait
CAT	Catalase
Cu²⁺	Ion cuivre
DL50	Dose mortel 50
DM	Deltamethrine
DO	Densitéoptique
DTNB	5.5'-Dithion-bis-(2-nitrobenzoic acid
e-	Electron
ERO	reactive oxygène species
EOA	EspècesoxygénéesActives
Fe²⁺	ion fer
GPX	Glutathionperoxydase
GRase	Glutathione réductase
GSH	Glutathionréduit
GSHPX	phospholipide-hydroperoxyde glutathione peroxydase
GSSG	Glutathion disulfide
GP	Gain de poids
H₂O	Eau
H₂O₂	Peroxyded'hydrogène
H	Atome hydrogène
Kg	Kilogramme
LCT	Lambda cyhalothrine
MDA	AcideMalondialdéhyde

mmol	Milimole
NaCl	Acidechlorhydrique
NADPH	Nicotinamide-adéninedinucléotide-phosphate réduit.
NADP	Nicotinamide-adéninedinucléotide-phosphate
NO	Monoxyded'azote
NaH₂PO₄	Mono Sodium phosphate
Na₂H₂PO₄	diummonosoup
O₂	Oygène
O₂•-	Anion superoxyde
OH*	Radical hydroxyle
PRF	Poidsrelatif de foie
PF	Poids de foie
PE	Poids d'extrait
PT	Poids totale
R	Radical
RH	Radical libreoxygéné
ROOH	Hydroperoxydes
ROH	Alcool
RT	Rendement
SEM	standard d'erreurmoyenne
SOD	superoxyde dismutase
TBA	Acidethiobarbiturique
TBS	Tris buffered saline
TCA	Trichloroacétique.
T	Témoin
Zn	Zinc

Table des matières

ملخص

Abstract

Résumé

Dédicace

Remerciement

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Sommaire

Introduction

1^{er} Partie : Recherche bibliographique

Chapitre 01 : Les pesticides et le système hépatique

I. Les pesticides et le système hépatique	03
I.1. Les pesticides	03
I.1.1. Définition des pesticides	03
I.1.2. Classification des pesticides	03
I.1.2.1. Classification par cible	03
I.1.2.2. Classification par famille chimique	03
I.1.2. Famille de pyréthriinoïde	04
I.1.2.1. Deltaméthrine	04
I.1.2.1.1. Définition	05
I.1.2.1.2. Structure chimique de deltaméthrine	05
I.1.2.1.3. Utilisation de deltaméthrine	05
I.1.2.1.4. Mode d'action de deltaméthrine	05
I.1.2.1.5. Toxicité de deltaméthrine	06
I.1.2.1.6. Métabolisme	06
I.1.2.2. Lambda cyhalothrine	07
I.1.2. 2.1. Définition	07
I.1.2 2.2. Structure de la lambda cyhalothrine	07
I.1.2. 2.3. Utilisation de Lambda cyhalothrine	07
I.1.2. 2.4. Mode d'action	08
I.1.2.2. 5. Toxicité de la lambda cyhalothrine	08

I.1.2. 2.6. Métabolisme	08
I.1.3. Utilisation des pesticides	08
I.1.4. Impact sur l'environnement	08
I.1.5. Modes d'exposition de l'homme aux pesticides et effets sur la santé	09
I.1.6. Effets toxiques des pesticides	10
I.1.6.1. Toxicité aiguë	10
I.1.6.1. Toxicité chronique	10
I.2. Système hépatique	12
I.2.1. Foie	12
I.2.2. Hépatotoxicité des pesticides	13
<i>Chapitre 02 : stress oxydatif</i>	
II. Stress oxydatif	14
II.1. Définition	14
II.2. Radicaux libres	14
II.2.1. Principales cibles biologiques des radicaux	14
II.2.1.1. Acide désoxyribonucléique ou ADN	14
II.2.1.2. Oxydations des protéines	15
II.2.1.3. Les lipoprotéines	15
II.2.2. Les sources des radicaux libres	15
II.2.3. Les espèce réactive d'oxygène	16
II.2.3.1. Anion superoxyde O_2^-	16
II.2.3.2. Peroxyde d'hydrogène ou eau oxygène H_2O_2	17
II.2.3.3. Radical hydroxyle OH^\cdot	17
II.3. Stress oxydatif et les conséquences	18
II.4. Systèmes de défenses antioxydants	19
II.4.1. Systèmes de défenses enzymatiques	19
II.4.1.1. Superoxyde dismutase (SOD)	19
II.4.1.2. Catalase	20
II.4.1.3. Glutathion peroxydase (GPx) et réductase (GRase)	20
II.4.2. Systèmes antioxydants non enzymatiques	21
II.4.2.1. Glutathion	21
II.4.2.2. Malondialdéhyde (MDA)	22
II.4.2.3. Vitamine C (acide L-ascorbique)	22
II.4.2.4. Les poly phénols	23

Chapitre 03 : La grenade

III. La grenade	24
III.1. Généralité sur la grenade	24
III.2. Nomenclature	24
III.3. Origine géographique et aire de répartition de la grenade	24
III.4. Classification de <i>Punica granatum</i>.L 1753	24
III.5. Caractères botaniques	24
III.6. Propriétés pharmacologiques	24
III.7. Propriétés toxicologiques de <i>Punica granatum</i> L.1753	25
III.8. Toxicité	25
III.9. Composée phénolique de l'extrait	26
<i>2^{eme} Partie : Materiel et methodes</i>	
I. Matériel biologique	30
I.1 Animaux	30
II. Matériel végétale	31
II.1. Réalisation de l'extrait brut de (<i>Punica granatum</i> L. 1753).	31
II.1.1. Préparation	31
II.1.2. Protocole	31
II.1.3. Calcul le rendement	31
III. Matériels chimique	32
IV. Conditions d'élevage	32
IV.1. Traitement des souris	33
IV.2. Choix des doses	33
IV.3. Mesure de poids (g)	33
V. Sacrifices et extraction d'organes	34
V.1. Poids relatif du foie	35
VI. Dosage	35
VI.1. Préparation des solutions	36
VI.1.1. Préparation des solutions pour le dosage du stress oxydant	37
VI.1.2.1. Solution de dosage glutathion peroxydas (Gpx)	37
VI. 1.2.2. Solution de l'activité catalase (CAT)	37
VI.1.2.3. Solution de dosage du (MDA) malondialdéhide	38
VI.1.2. Solution de dosage métabolique	38
VI.1.2.1. Solution pour protéine	38

VI.1.2.2. Solutions pour les lipides	39
VI.1.2.3. Solutions pour les glucides	39
VI.2. Préparation des échantillons	38
VI.2.1. Dosage des métabolites	39
VI.2.1.1. Dosage des protéines (mg)	39
VI. 2.1.2. Dosage des lipides (mg)	40
VI.2.1.3. Dosage des glucides (mg)	40
VI.2.1. Évaluation des paramètres du stress oxydant	41
VI.2.1.1. Dosage MDA	41
VI.2.1.2. Dosage de glutathion peroxydase (GPx)	42
VI.2.1.3. Dosage l'activité Catalase (CAT)	42

3^{eme} Partie : Résultats et discussion

I. Résultats	44
I.1. Rendement	44
I.2. Effets des pesticides et de la (<i>Punica granatum</i>) sur les paramètres de la croissance globale des souris.	45
I.2.1. Gain de poids.	44
I.2.2. Poids relatif du foie	46
I.3. Étude des paramètres biochimiques et enzymatiques	46
I.3.1. Effet des pesticides et <i>Punica granatum</i> sur les paramètres biochimiques au niveau hépatique chez les souris	46
I.3.1.1. Taux des protéines	46
I.3.1.2. Taux des lipides	47
I.3.1.3. Taux des glucides	48
I.3.2. Effet des pesticides et la <i>Punica granatum</i> sur les paramètres enzymatiques chez les souris.	49
I.3.2.1. Effet des pesticides et la <i>Punica granatum</i> sur les variations de l'activité de la glutathion peroxydase GPx	49
I.3.2.2. Effet des pesticides et la <i>Punica granatum</i> sur la teneur de malondialdéhyde (MDA)	50
I.3.2.3. Effet des pesticides et la <i>Punica granatum</i> sur la teneur de catalase (CAT)	50
II. Discussion générale	53
II.1. Effets des pesticides et la <i>Punica granatum</i> sur les paramètres de la croissance globale	54
II.2. Effets des pesticides et <i>Punica granatum</i> sur les paramètres métaboliques chez les souris	55

II.3. Effets des pesticides sur l'activité de GPx au niveau de foie chez les souris.	55
II.4. Effets des pesticides sur l'activité de catalase (CAT) au niveau de foie chez les souris	56
II.5. Effets des pesticides sur le malondialdéhyde (MDA) au niveau de foie chez les souris	56
II.6. Effet de <i>Punica granatum</i> sur les paramètres de stress oxydatif	57
Conclusion	
Référence	
Annexes	

PARTIE

BIBLIOGRAPHIE

Introduction

Introduction

Les pesticides sont des composés chimiques dotés de propriétés toxicologiques, utilisés par les agriculteurs pour lutter contre les animaux ou les plantes jugés nuisibles aux plantations, ces substances sont considérés comme la troisième cause de pollution dans le monde (**Multinger, 2005**). L'usage des pesticides a considérablement augmenté au cours des dernières décennies créant un danger croissant pour la santé des populations, puisque même une exposition de faible intensité a un risque à long terme qui est plus difficile à apprécier, cesans parler des effets à court terme qui sont de mieux en mieux connus (effets neurologiques, cancers, malformations congénitales, système immunitaire affaibli et troubles de la reproduction) (**Baldi et al. 1996 ; Tron et al. 2001**).

Les pyréthrinoïdes, constituent aujourd'hui la famille d'insecticides la plus utilisés. Ils sont utilisés contre une grande variété d'insectes en agriculture, horticulture, dans le domaine forestier, en santé publique (dans les hôpitaux) et dans les résidences, Les pyréthrinoïdes les plus connus et utilisés commercialement sont la perméthrine, la cyperméthrine, la cyfluthrine, la deltaméthrine et lambda cyhalothrine, Ils se retrouvent dans l'environnement essentiellement en raison de leur usage comme insecticides. Dans l'air, ils sont rapidement détruits par le soleil. Ils sont fixés fortement aux sols et peuvent être dégradés par les organismes présents dans le sol et l'eau. Si, en général, ils sont relativement peu toxiques pour les mammifères, les pyréthrinoïdes sont des insecticides de synthèse très toxiques pour les organismes aquatiques et les animaux à sang froid. La plus faible toxicité chez les mammifères s'explique par une faible absorption par la peau et une transformation rapide dans l'organisme (**Bouvier, 2005**).

La grenade est l'un des produits les plus riches en antioxydants notamment les polyphénols solubles, les tanins et les anthocyanes. Ces constituants présentent diverses activités biologiques telles que l'élimination des radicaux libres, l'inhibition de la croissance microbienne et la diminution des risques de maladies cardiovasculaires, cérébrovasculaires et certains cancers (**Mena et al. 2011**). Les extraits de la grenade peuvent être utilisés aussi pour la prévention ou la guérison de l'athérosclérose, des diarrhées, des ulcères gastriques et des maladies liées à l'œstrogène telle que la maladie de Paget du mamelon (**Holland et al. 2009**). C'est pour ces raisons que la culture de la grenade connaît un regain d'intérêt dans plusieurs pays en raison d'une demande assez forte de ces fruits sur le marché.

Le but de L'étude :

- Connait les effets toxiques de deux pesticides sur le système hépatique de la souris.
- Connait l'effet protecteur du plant médicinal (*Punica granatum L.1753*) sur le système hépatique de la souris.

Chapitre 1:

Pesticides et hépatotoxicité

Chapitre 1 : Pesticides et hépatotoxicité

I. Pesticides et hépto-toxicité

I.1. Pesticides

I.1.1. Définition des pesticides

Le terme "pesticides" est une appellation générique couvrant toutes les substances (molécules) ou produits (formulations) qui éliminent les organismes nuisibles, qu'ils soient utilisés dans le secteur agricole afin d'améliorer les rendements et la qualité des productions agricoles, ou bien dans d'autres d'application (Medjdoub, 2013).

I.1.2. Classification des pesticides

I.1.2.1. Classification par cible

Les pesticides peuvent être classés selon l'organisme ciblé (Tableau 1).

Tableau 1:Classification des pesticides selon les organismes ciblés (Perrine et Branchet, 2018).

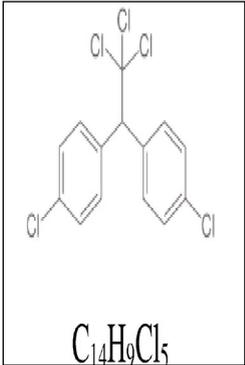
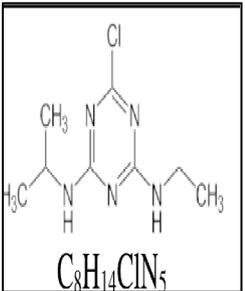
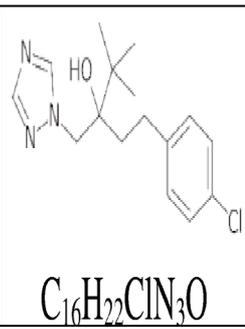
Type de pesticides	Organisms vivantsciblés
Acaricides	Acariens
Algicides	Algues
Avicides	Oiseaux
Bactéricides	Bactéries
Fongicides	Champignons
Herbicides	Herbacées
Insecticides	Insectes
Mollusquicides	Mollusques
Rongicides	Rongeurs
Virucides	Virus

I.1.2.2. Classification par famille chimique

La classe chimique des pesticides permet d'évaluer leurs propriétés physico chimiques dont découlent leur efficacité et leur mode d'application (relation structure/fonction). Il existe plusieurs dizaines de classes chimiques de pesticides dont quelques-unes sont présentées ci-dessous (Perrine et Branchet, 2018).

Chapitre 1 : Pesticides et hépatotoxicité

Tableau 02: Structure chimique formules brutes mode d'action et de quelque substance actives pesticides appartenant à différents familles chimiques (**Perrine et Branchet, 2018**).

Substance active	Famille chimique	Structure chimique et formule brute	Généralité le mode d'action	Effet
Deltaméthrine Lambda cyhalothrine	Pyréthroïdes	 $C_{14}H_9Cl_5$	Ouverture du canal sodium des neurones Transmission continue de l'influx nerveux Convulsion tétanique	Insecticide
Atrazine	Triazine	 $C_8H_{14}ClN_5$	Blocage du transfert des électrons dans le photosystème II Blocage photosynthèse; mort du plant	Herbicide
Tébuconazole	Triazole	 $C_{16}H_{22}ClN_3O$	Inhibition de la biosynthèse de l'ergostérol de membrane des champignons	Fongicide

I.1.3. Famille de pyréthroïdes

Les pyréthroïdes 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; Elliott, 1976; Morgan et al. 2016**) par exemple (Deltaméthrine; Lambda cyhalothrine).

Chapitre 1 : Pesticides et hépatotoxicité

I.1.3.1.5. Toxicité de délthamétrine

Une abondante littérature disponible sur la toxicocinétique de cet insecticide révèle que, chez les mammifères, l'étape primaire de détoxification est le clivage de l'ester suivi de l'hydroxylation (**Casida et al. 1983**). Le taux de désintoxication est très élevé chez les mammifères que chez les insectes, ce qui conduit à un taux élevé de toxicité pour les insectes et les mammifères (**Elliot, 1976 ; Aldridge, 1990**). En solution, dans un solvant non aqueux, la deltaméthrine présente sa plus faible DL50 de 19mg/kg par voie orale chez la souris et d'environ 130 mg/kg/j chez le rat (**IPCS, 1990**). La toxicité de DM par voie cutanée est faible; la DL50 correspondante est supérieure à 800mg/kg chez le rat et supérieure à 2000 mg/kg chez le lapin (**INRS, 2016**). L'intoxication aiguë se manifeste chez le rat et la souris par les signes suivants: hyper salivation, diarrhée, dyspnée, faiblesse, défaut de coordination motrice, hypotonie, tremblements, mouvements cholériformes, tachycardie, difficultés respiratoires et convulsions cloniques. Les paralysies des muscles respiratoires sont susceptibles de conduire à la mort. La sévérité des symptômes est corrélée à la concentration de DM dans le cerveau (**He et al, 1989 ; INRS, 2016**). La deltaméthrine provoque une salivation excessive, secousses cloniques, mouvements involontaires, convulsions toniques et cloniques. On a noté aussi des altérations neurologiques avec démyélinisation (**Scassellati et al, 1994 ; Toumi, 2013**).

I.1.3.1.6. Métabolisme

La deltaméthrine est métabolisée en composés non toxiques par oxydation, par hydrolyse de la fonction ester et par conversion du groupement cyano en thiocyanate. Chez l'homme, elle est rapidement métabolisée au niveau hépatique avec formation d'acide 3- phénoxybenzoïque, d'acide décamétrique (Ou acide cis-3-(2,2-dibromovinyl)-2,2-diméthyl-cyclopropane-1- carboxylique ou cis-Br2CA). Les métabolites oxydés sont ensuite sulfo- ou gluco- conjugués facilitant ainsi leur élimination dans les urines (**Gasmi S; 2018**).

Chapitre 1 : Pesticides et hépatotoxicité

I.1.3.2. Lambda cyhalothrine

I.1.3.2.1. Définition

La lambda cyhalothrine est un insecticide pyréthriinoïde de synthèse de type II, dont les utilisations en agriculture sont de plus en plus importantes (Ansari *et al.* 2012; Fetoui *et al.* 2009; Iyyadurai *et al.* 2014).

Cette substance active est constituée de deux des quatre formes énantiomères de lambda cyhalothrine. Il s'agit d'une molécule à large spectre contre les insectes ravageurs des cultures (Fetoui *et al.* 2009)

I.1.3.2.2. Structure de lambda cyhalothrine

La lambda cyhalothrine présente une structure moléculaire $C_{23}H_{19}ClF_3NO_3$ masse moléculaire de 449,9 g / mol et son la solubilité dans l'eau est de 0,005 mg / L. Il est soluble dans d'autres solvants comme l'acétone, le méthanol, le toluène, l'hexane (Dogan *et al.* 2016) et présente une odeur légère et une vapeur d'équilibre négligeable pression à 20 °C avec un P_b de 499 °C (Zhao *et al.* 2008).

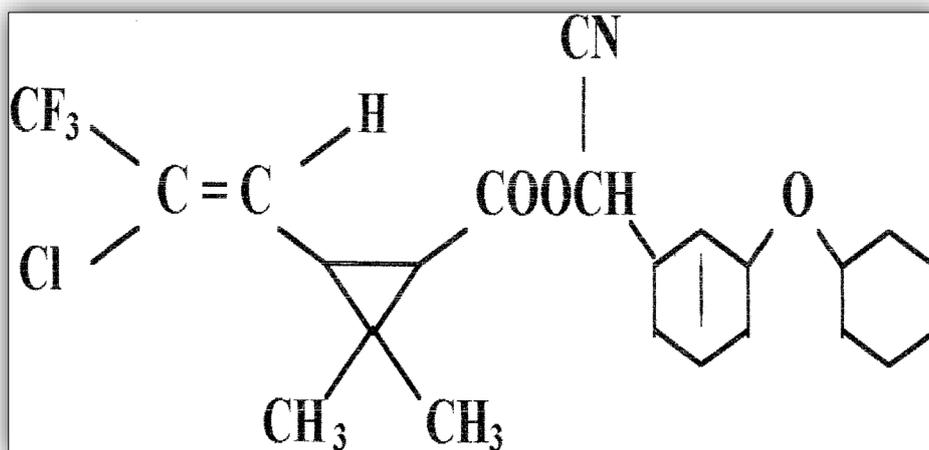


Figure02: Structure chimique de la lambda cyhalothrine (Hrouna et Soumare, 2010).

I.1.3.2.3. Utilisation de Lamda cyhalothrine

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

Chapitre 1 : Pesticides et hépatotoxicité

I.1.3.2.4. Mode d'action

Lambda cyhalothrine agit comme un poison axonique sur le système nerveux périphérique et central de l'insecte (**Li Ming, 2008**). En effet, le canal sodique voltage-dépendant de la membrane des cellules nerveuses est le principal site d'action des pyréthriinoïdes (**Li-Ming, 2008**). De même, il a été montré que les pyréthriinoïdes, plus particulièrement la lambda cyhalothrine inhibe la fermeture des canaux sodiques et donc perturbe le fonctionnement normal du système nerveux. La lambda cyhalothrine pénètre plus précisément la cuticule de l'insecte, perturbe la conduction nerveuse dans les minutes qui suivent; ce qui conduit à la cessation de l'alimentation, la perte de contrôle musculaire, la paralysie et la mort éventuelle (**Li Ming, 2008**).

I.1.3.2.5. Toxicité de la lambda cyhalothrine

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

I.1.3.2.6. Métabolisme

Des études ont montré que les pyréthriinoïdes sont métabolisés dans le foie suite à une rupture de leur liaison ester (**Scollon et al. 2009**). Ceci est catalysé par les carboxyles stérés humaines (h-CE1 et h-CE2) ou par le cytochrome P450 (**Ross et al. 2006**). De plus, les recherches de **Ross et al. 2006** ont montré que le taux d'hydrolyse des métabolites des pyréthriinoïdes était similaire chez l'homme, la souris et le rat. Dans le cas de la lambda cyhalothrine, cette molécule se scinde pour produire trois principaux métabolites, l'acide 3-phénoxybenzoïque (3-PBA), l'acide cis-3-(2-chloro-3,3,3-trifluoroprop-1-en-1-yl)-2,2-diméthylcyclopropane

Chapitre 1 : Pesticides et hépatotoxicité

carboxylique (CFMP) et l'acide 3-(4'-hydroxybenzoïque (4-OH-3-PBA) (Kaneko et Miyamoto, 2001).

I.1.4. Utilisation des pesticides

Dans l'agriculture les pesticides sont utilisés pour lutter contre les insectes, les parasites, les champignons et les herbes estimés nuisibles à la production et à la conservation de cultures et produits agricoles ainsi que pour le traitement des locaux. (Ayad et Mokhtari, 2012).

I.1.5. Impact sur l'environnement

Les pesticides peuvent contaminer le sol, l'eau, le gazon et toute autre végétation. En plus de tuer les insectes ou les mauvaises herbes, les pesticides peuvent être toxiques pour une foule d'autres organismes, y compris les oiseaux, poissons, insectes utiles et plantes non ciblées. Les insecticides sont généralement la classe de pesticides la plus toxique, mais les herbicides peuvent également présenter des risques pour les organisations non ciblées (WasimAktar et al. 2009).

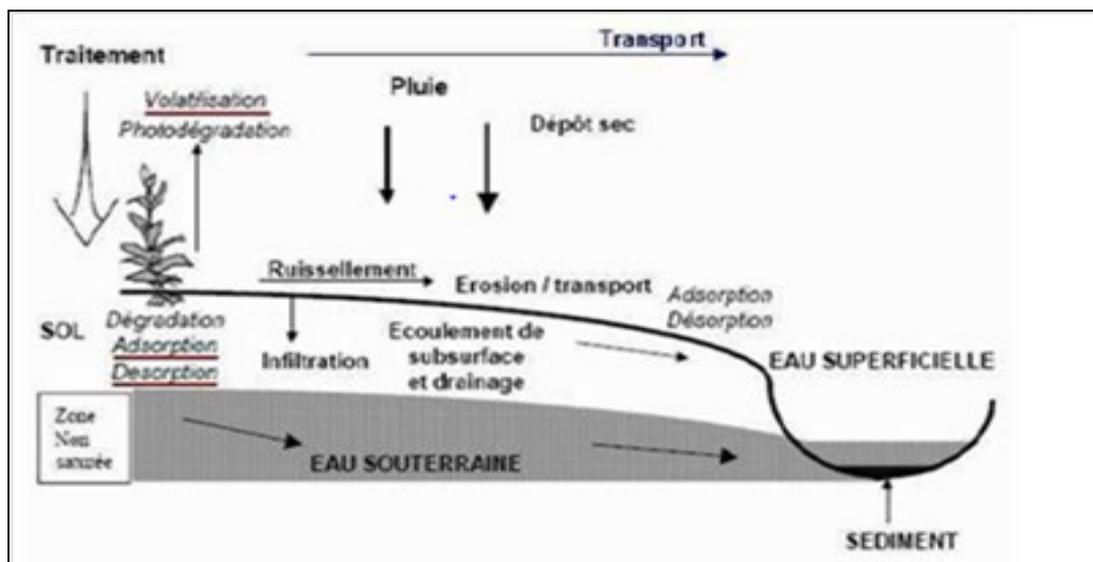


Figure03: Mécanismes de transferts et de transformations des pesticides dans les milieux de l'environnement (Ineirs, 2005).

I.1.5 Modes d'exposition de l'homme aux pesticides et effets sur la santé

Les crises sanitaires récentes obligent à mieux comprendre et articuler les liens entre agriculture, environnement et santé publique. Le risque des pesticides pour l'homme se situe à l'interface de ces trois domaines. Il s'agit d'un risque global intégratif, qui naît du cumul des expositions auquel est soumis un être vivant. Les voies dermique, respiratoire (pour les utilisateurs directs de produits phytosanitaires par exemple) et

Chapitre 1 : Pesticides et hépatotoxicité

orale peuvent être sollicitées. Il concerne à la fois les professionnels et le grand public. Des problèmes de résidus dans les légumes, les fruits, etc., sont aussi mis en évidence car les aliments constituent une voie majeure d'exposition en raison de leurs niveaux plus élevés de contamination (Madjdoub, 2013).

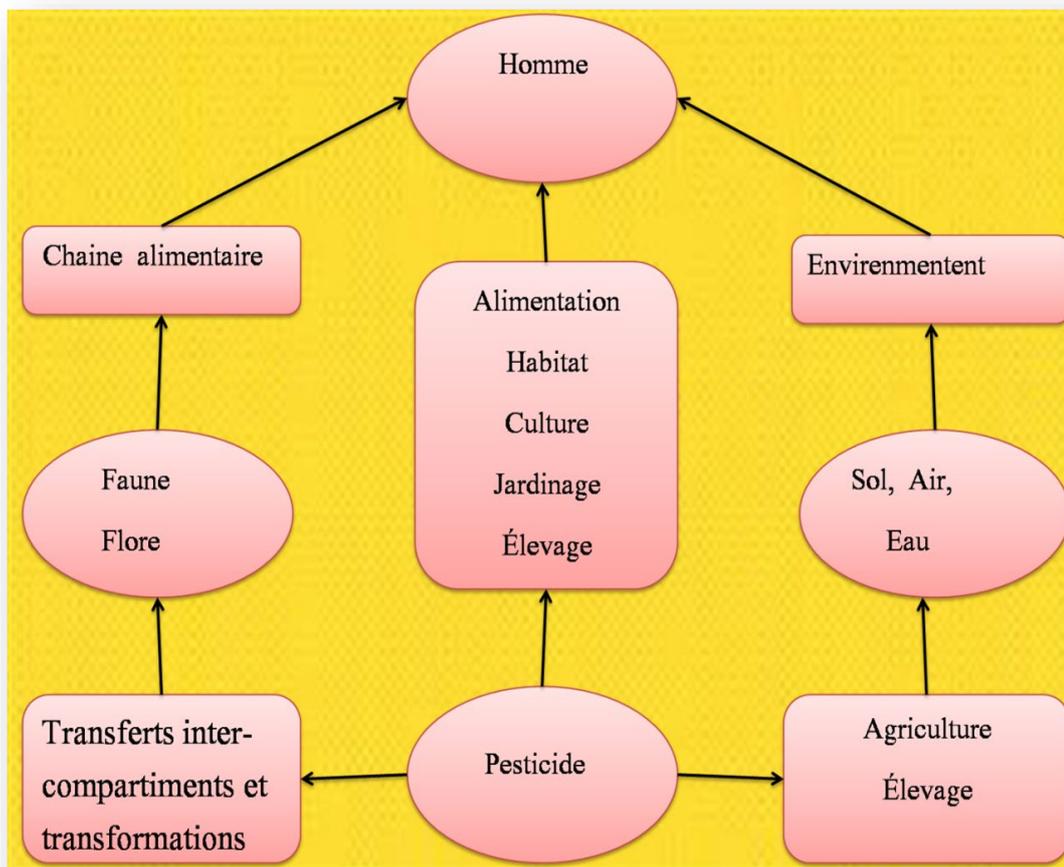


Figure 04: Modes d'exposition de l'homme et des milieux par les pesticides (CPP, 2002).

I.1.6. Les effets toxiques des pesticides

Plusieurs études de santé ont démontré les risques de toxicité aiguë et chronique pour les agriculteurs exposés aux pesticides.

I.1.6.1. Toxicité aiguë

Les effets liés à une intoxication aiguë se produisent généralement tout de suite ou peu de temps (exposition à court terme) après une exposition significative à des pesticides. L'évaluation de la toxicité aiguë d'une matière active sur l'homme se fait par le calcul de la DL50 sur un animal de laboratoire : rat, souris, lapin (dose létale 50%) qui est une estimation statistique du nombre de milligrammes de la substance toxique par kilogramme de poids qui va tuer 50% d'une population expérimentale.

Chapitre 1 : Pesticides et hépatotoxicité

Dans ce système, l'OMS considère un pesticides extrêmement dangereux (classe I) ou très dangereux (classe II) si elle a une valeur DL50 faible **(Chiali, 2013)**.

I.1.6.2. Toxicité chronique

La majorité des intoxications causées par les pesticides n'apparaissent pas dès le premier contact, mais après des expositions répétées et à long terme **(Lawan et al.2007)**. Les effets chroniques sur la santé liés aux pesticides concernent les cancers et tumeurs, les troubles du système nerveux, des problèmes de reproduction, les effets sur le système immunitaire, la perturbation du système endocrinien **(Weinberg, 2009)**.

Chapitre 1 : Pesticides et hépatotoxicité

I.2. Système hépatique

I.2.1. Foie

Le foie de la souris est un organe asymétrique composé de deux lobes qui, par ses différentes fonctions, contribue au maintien de l'homéostasie de l'organisme. Il synthétise diverses molécules essentielles et permet d'extraire et de métaboliser les nutriments et xénobiotiques introduits dans l'organisme en partie via le système digestif. Le parenchyme (tissu fonctionnel) est composé de sept types cellulaires : les hépatocytes, les cholangiocytes, les cellules endothéliales sinusoidales, les cellules de Küpffer, les lymphocytes, les cellules dendritiques et les cellules étoilées. Leur agencement favorise leurs interactions. Ces cellules se rassemblent dans le lobule hépatique qui comprend une veinule centrolobulaire, autour de laquelle le parenchyme hépatique se répartit de façon polygonale avec les angles constitués d'espaces portes. Ces derniers sont constitués d'une veinule porte, d'une artériole hépatique et d'un canalicule biliaire.

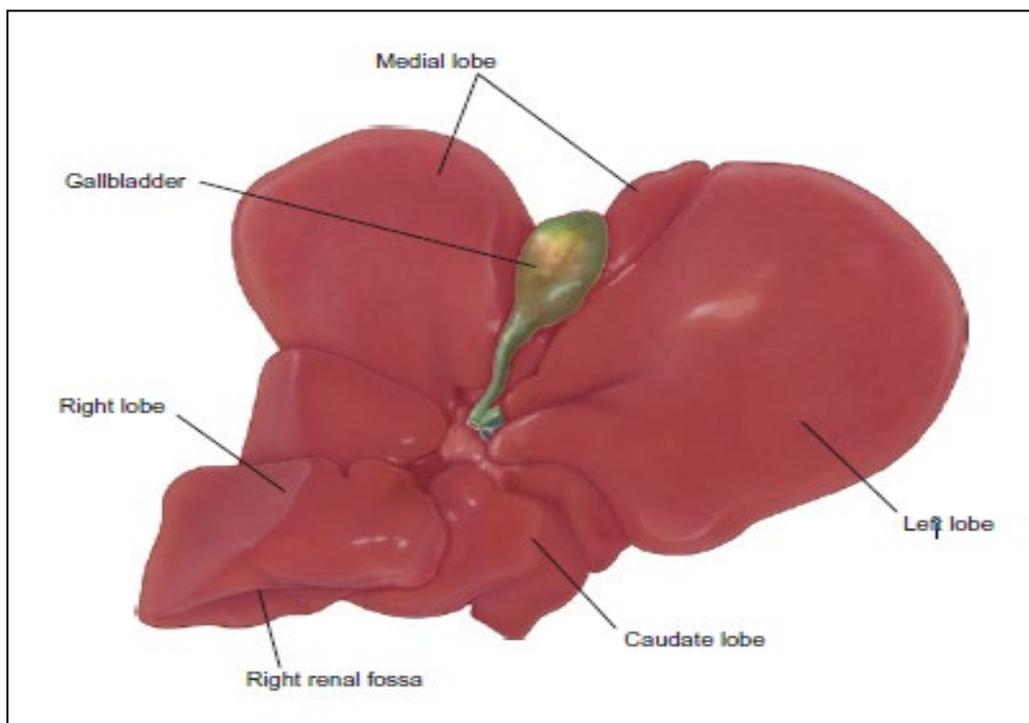


Figure 05 : Le foie de la souris (Hollander F. 1987).

Chapitre 1 : Pesticides et hépatotoxicité

I.2.2. Hépto- toxicité des pesticides

Le foie est le premier organe qui fait face à toutes les molécules étrangères emmenées par la circulation et c'est ainsi qu'il est l'un des organes soumis à plus de dégâts. Les transaminases ASAT (Aspartate amino transférase), ALAT (Alanine amino transférase) et ALKP ou PAL (phosphatases alcalines) sont des enzymes hépatiques importantes et responsables des processus de détoxication (**Abbassy et al. 2012**). Ces enzymes sont sécrétées dans la circulation sanguine et leur taux augmente dans le sang au cours des lésions hépatocellulaires. Ces variations peuvent varier en fonction de la durée d'exposition et de la dose. L'augmentation des activités de ces enzymes dans le sérum est indicative de lésions du foie, des reins et des muscles (**Mairif S.2015**).

Chapitre 2:

STRESS OXYDATIF

Chapitre 2 : Stress oxydatif

II. Stress oxydatif

II.1. Définition

Le stress oxydatif est un état caractérisé par un déséquilibre entre la production des espèces réactives de l'oxygène et les capacités antioxydants de l'organisme (enzymes antioxydants et systèmes antioxydants non enzymatiques) (Delattre et al. 2005). Un stress oxydatif peut être induit lors de la surproduction d'espèces réactives et /ou par suite de l'inhibition des systèmes antioxydants qui peuvent être inactivés, soit directement, soit par défaut de synthèse (Pgc. Campbell .2004).

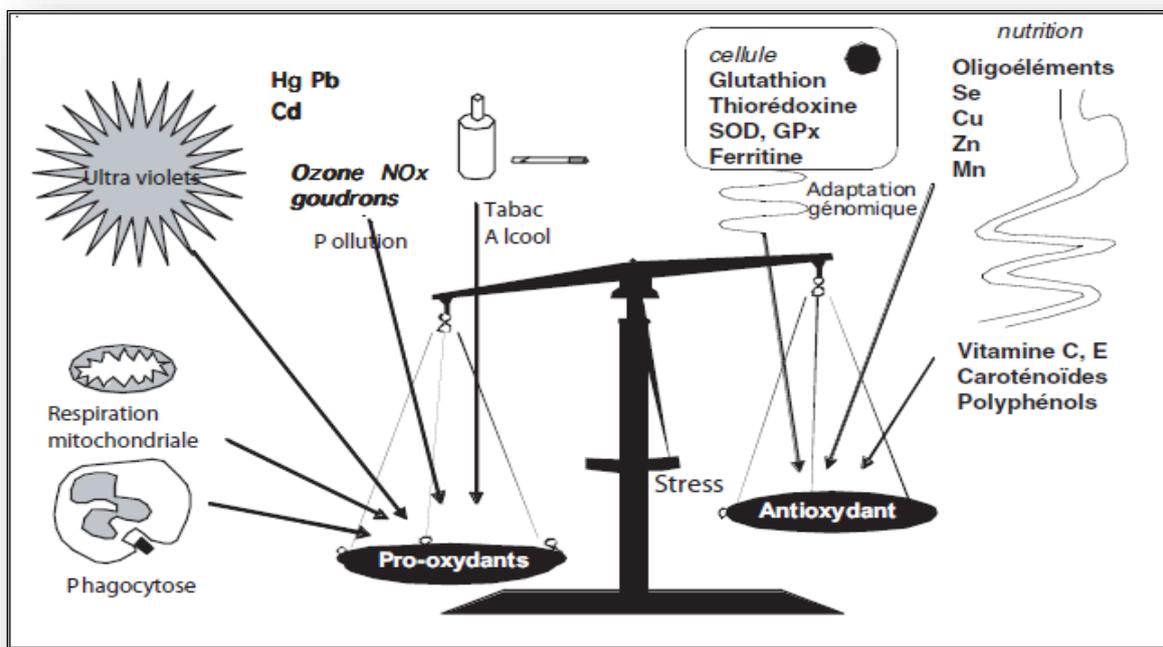


Figure 06 : La balance d'équilibre entre les systèmes pro et antioxydants (Favie.2006).

II.2. Radicaux libres

Un radical libre est une espèce chimique possédant un électron célibataire sur sa couche périphérique, rendant ainsi cette espèce chimique particulièrement instable. Lorsque cet électron célibataire est situé sur un atome d'oxygène, on parle alors « d'espèces réactives de l'oxygène » (ERO) ou « reactive oxygen species » (RO)(Beaudeau J.2005).

II.2.1. Principales cibles biologiques des radicaux libres

II.2.1.1. Acide désoxyribonucléique ou ADN

L'ADN est une cible privilégiée pour les radicaux libres. La guanine, par exemple, peut réagir avec $\text{OH}\cdot$ pour former la 8-hydroxy-2'-déoxyguanosine (8-OH-dG) qui, au lieu de s'apparier avec la cytosine, s'associera avec l'adénine, entraînant des mutations au sein de

Chapitre 2 : Stress oxydatif

l'ADN et conduisant à des altérations du message génétique impliquées dans le déclenchement du cancer et le vieillissement ((Haleng Jet *al.* 2007).

II.2.1.2. Oxydation des protéines

Les radicaux libres oxygénés induits des modifications dans les structures primaires, secondaires et tertiaires des protéines par la formation des dérivés protéiques carbonylés via plusieurs mécanismes incluant la fragmentation et l'oxydation des acides aminés (Gassmi S.2018).

II.2.1.3. Lipoprotéines

L'attaque radicalaire des lipoprotéines circulantes aboutit à la formation de LDL oxydées, qui seront captées par des récepteurs spécifiques des macrophages. L'activité de ces récepteurs n'étant pas régulée par la concentration intracellulaire en cholestérol, les macrophages se transforment petit à petit en cellules spumeuses (rôle important dans les premières étapes de l'athérosclérose). En outre, ces LDL oxydées sont immunogènes et les immuns complexes formés peuvent activer la voie classique du complément et générer la sécrétion de cytokines pro inflammatoires par les macrophages (Haleng Jet *al.*2007).

II.2.2. Sources des radicaux libres

Les radicaux libres sont produits naturellement par l'organisme (Milane, 2004)

- au niveau de la respiration mitochondriale, lorsque l'oxygène échappe à la réduction complète en H_2O , il est estimé 2 à 5% de l'oxygène consommé au niveau mitochondrie est transformé en radicaux superoxydes O_2^\bullet de manière continue et physiologique.
- au niveau de certains organites cellulaires tels que les peroxysomes et des lysosomes, d'autres sources des espèces réactives de l'oxygène (ERO) ont été identifiées dans la cellule tel que la xanthine oxydase, la famille du cytochrome P450 et les enzymes de la voie de l'acide arachidonique (Baraud, 2011). Ont démontré qu'ils existent des promoteurs de tumeurs qui peuvent induire la formation de peroxyde d'hydrogène par des leucocytes humains. De plus la pollution, la cigarette et de nombreux agents chimiques peuvent être à l'origine d'une production accrue de radicaux libres (Frenkel et Chrzan (1987).

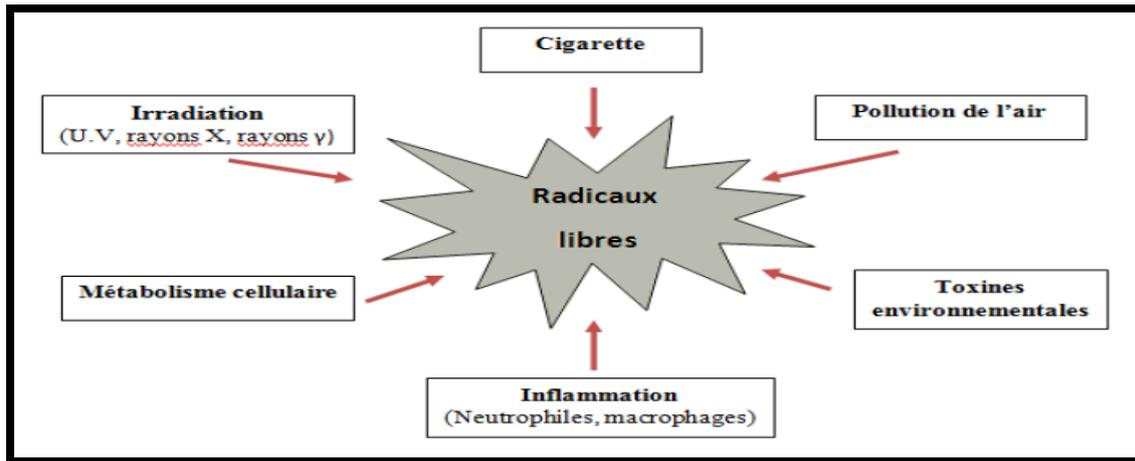


Figure 07: Résumé des sources exogènes et endogènes de radicaux libre (Douaouri, 2018).

II.2.3. Espèces réactives d'oxygène

L'oxygène est un radical libre peu réactif, présent le plus souvent sous forme de dioxygène (O_2). Physiologiquement et dans certain circonstance, il est à l'origine de la formation de dérivés plus réactifs appelés espèces réactives oxygénées (ERO). Ces molécules sont très nombreux, de forme radicalaire (contenant un électron non apparié). Il existe de très nombreuses ERO mais les plus importants sont l'anion superoxyde (O_2^-), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), le radical hydroxyle (OH^\cdot), l'hypochlorite (ClO^-) et le peroxynitrite (NO_3^-) (Carole I .2011).

II.2.3.1. Anion superoxyde O_2^-

Le radical superoxyde est produit partir de l'oxygène moléculaire, principalement par les cellules phagocytaires (neutrophiles, monocytes, macrophages, éosinophiles), et il participe à l'inactivation des virus et bactéries. Ces cellules sont sources d'une importante quantité de radicaux libères dans le milieu environnant et susceptibles d'entraîner des esions tissulaires sévères, comme c'est le cas dans, l'activation de la xanthine oxydase par l'ischémie va provoquer une formation importante de radicaux superoxydes en présence d'oxygène lors de la reperd fusion (Favie R.2003)



La NADPH oxydase est également une source importante d'anion superoxyde



Chapitre 2 : Stress oxydatif

relativement stable, il n'est pas très toxique pour l'organisme. Mais il est à l'origine de cascades de réactions conduisant à la production de molécules très nocive (**Goudable J.1997**).



II.2.3.2. Peroxyde d'hydrogène ou eau oxygène H_2O_2

En milieu protoné, l'anion superoxyde subit généralement une réaction spontanée de dismutation, aboutissant à la formation de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et d'oxygène :

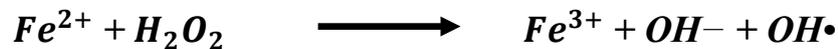


En présence de métaux de transition sous forme réduite, le peroxyde d'hydrogène se dégrade radical hydroxyle ($OH\cdot$), un radical libre très réactif (réaction de Fenton) (**Renald.S 2011**).

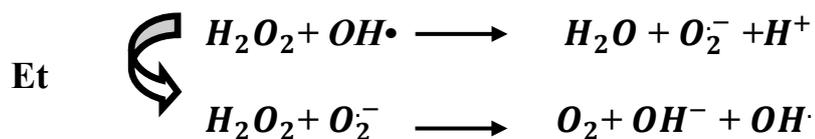


II.2.3.3. Radical hydroxyle $OH\cdot$

Le radical hydroxyle est un des oxydants les plus réactifs et le plus dangereux du système biologique, le peroxyde d'hydrogène serait transformé en radical hydroxyle par une succession de réactions en chaîne initiée par la réaction de Fenton



Suivie de la réaction de Haber-Weiss en deux étapes :



Chapitre 2 : Stress oxydatif

Le radical Hydroxyle réagit avec les lipides, polypeptides, protéines, et ADN, spécifiquement les thiamines et les guanosines (Goudable J.1997).

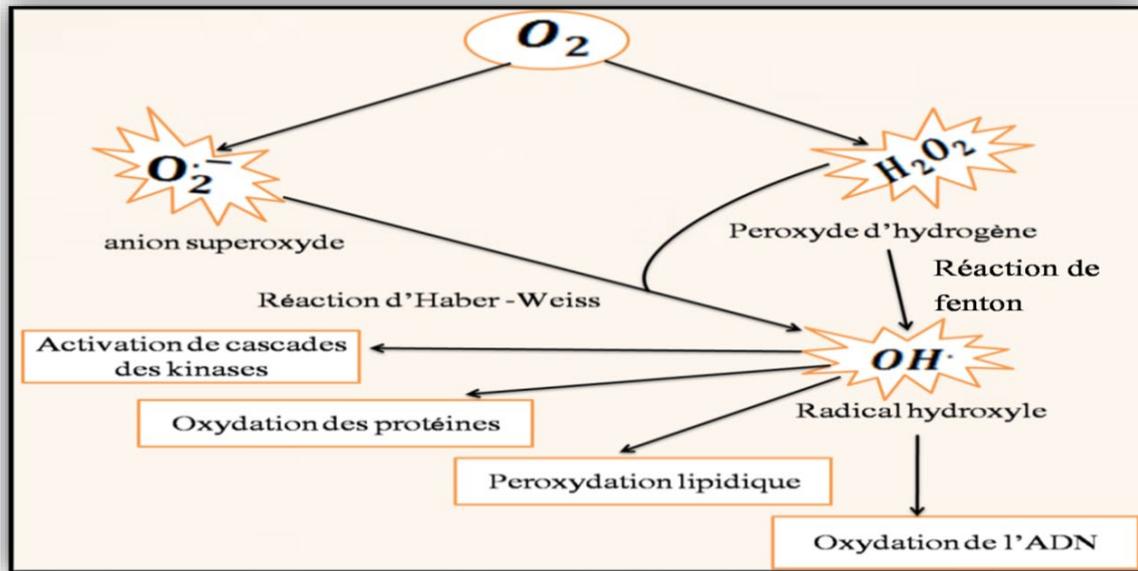


Figure 08 : Schéma des différentes formes des ROS (Blandine C .2006)

II.3. Stress oxydatif et les conséquences

Le stress oxydatif a été impliqué dans plusieurs maladies incluant le cancer, l'athérosclérose, le paludisme, le syndrome de la fatigue chronique, la polyarthrite rhumatoïde et des maladies neurodégénératives telles que la maladie de Parkinson, la maladie d'Alzheimer et la maladie de Huntington. L'évidence indirecte via la surveillance des biomarqueurs tels que les espèces réactives d'oxygène, et la production d'espèces réactives d'azote, la défense antioxydant indique des dommages oxydatifs qui peuvent être impliqué dans la pathogenèse de ces maladies (Rahman et al. 2012).

Chapitre 2 : Stress oxydatif

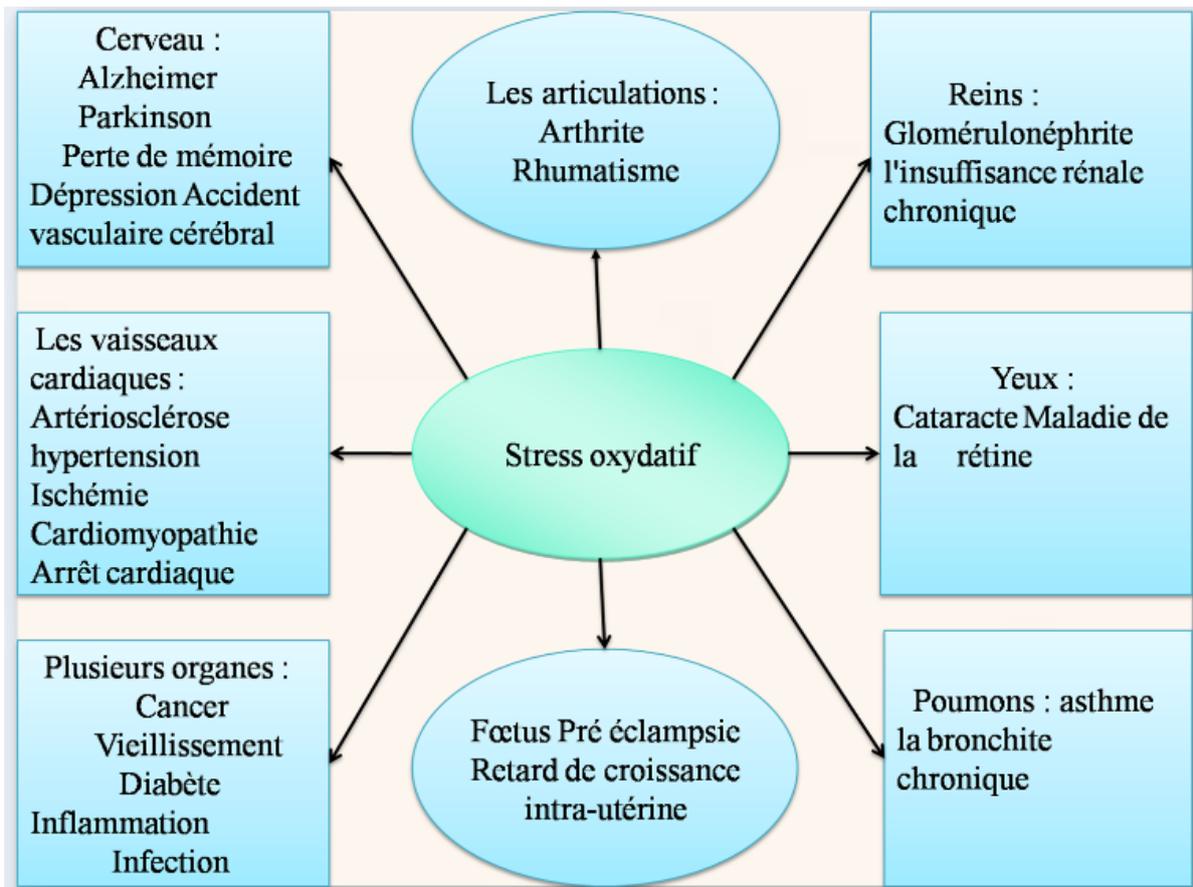


Figure 09 : Stress oxydatif et ses conséquences (Douaouri, 2018).

II.4. Systèmes de défenses antioxydants

Les radicaux libres sont produits spontanément et de manière continue au sein de notre organisme. Le maintien d'un niveau non cytotoxique de ROS est assuré par des systèmes antioxydants. Un déficit ou un dysfonctionnement de ces systèmes engendre un augmentation des dommages tissulaires. Les antioxydants sont des systèmes enzymatiques ou non-enzymatiques (Blandin, 2006).

II.4.1. Systèmes de défenses enzymatiques

II.4.1.1. Superoxyde dismutase (SOD)

Ces métalloprotéines, qui représentent une des premières lignes de défense contre le stress oxydant, assurent l'élimination de l'anion super-oxyde $O_2^{\bullet-}$ par une réaction de dismutation, en le transformant en peroxyde d'hydrogène et en oxygène selon la réaction suivant (Med liege R. 2007).

Chapitre 2 : Stress oxydatif

SOD (Cu/Zn)



II.4.1.2. Catalase

Elles réduisent le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 en libérant de l'oxygène et de l'eau selon la réaction suivante (Goudable J.1997).

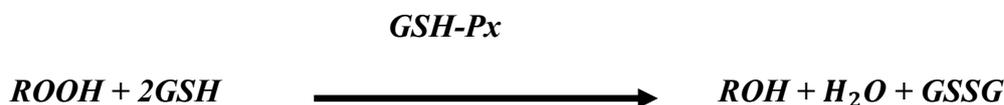
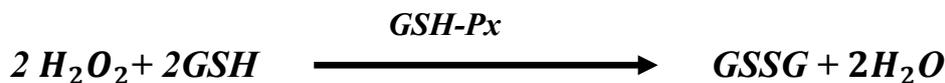
CAT



Le catalase est localisées surtout dans les peroxysomes. Elles n'éliminent pas la totalité du peroxyde d'hydrogène, mais leur rôle est très important surtout en présence d'ions ferreux en permettant d'éliminer l'excès de peroxyde d'hydrogène afin que la réaction de Fenton ne puisse pas s'amplifier (Favie R.2003).

II.4.1.3. Glutathion peroxydase (GPx) et réductase (GRase)

Les GSH-PX réduisent le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 et les hydroperoxydes lipidiques. Pour fonctionnement, elles utilisent le glutathion réduit (GSH) comme cofacteur sur lequel elles transfèrent l'oxygène, le transformant en glutathion oxydé (GSSG) elle réduit l' H_2O_2 en H_2O et les hydroperoxydes ($ROOH$) en alcools (ROH) selon les réactions suivent (Favie R. 2003).



L'efficacité de la GSH-Px est liée à un flux constant de GSH, et elle est couplée à l'oxydation du glucose-6 phosphate en 6-phospho gluconate, source de $NADPH_2$ qui est utilisé comme cofacteur par la glutathion réductase (*GRase*) pour régénérer le GSH :

Chapitre 2 : Stress oxydatif



La glutathion peroxydase (GSH-Px) agit en synergie avec la SOD puisque son rôle est d'accélérer la dismutation du H_2O_2 en H_2O et O_2^- . Il existe également une glutathion peroxydase associée à la membrane mitochondriale, la phospholipide-hydroperoxyde glutathion peroxydase (PHGPx) qui est spécifiquement impliquée dans la diminution de la peroxydation lipidique. La glutathion réductase, quant à elle, a pour rôle de régénérer le GSH à partir du GSSG grâce au NADPH qui est utilisé comme donneur d'électrons. En effet, la concentration cellulaire en glutathion étant limitée, il est nécessaire de le réduire constamment pour que la GSH-Px maintienne sa fonction. Ces deux enzymes sont présentes dans le cytosol et dans les mitochondries (Med liege R.2007).

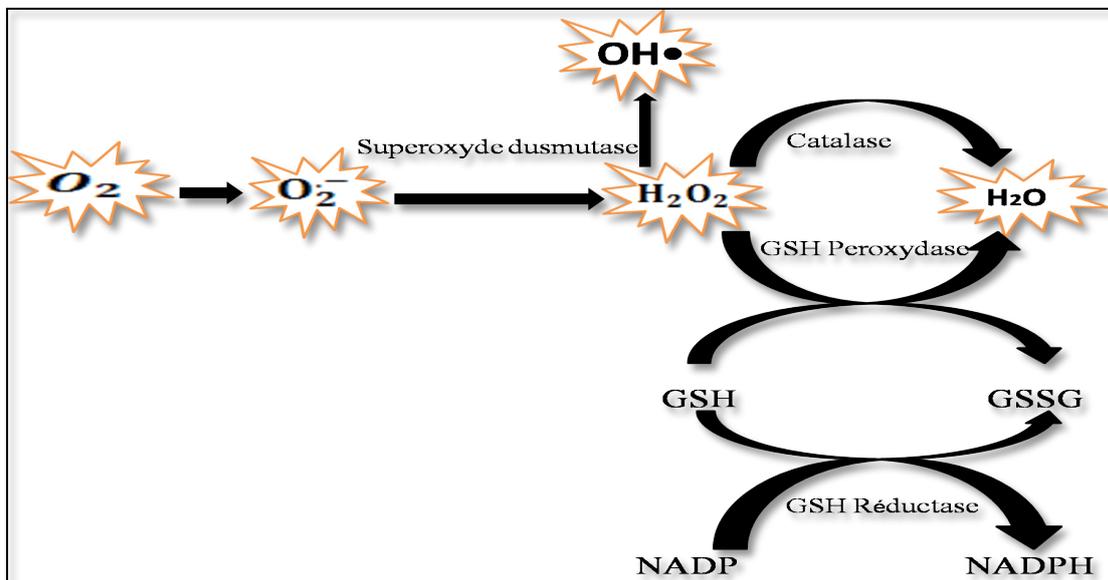


Figure 10 : Schéma des défenses antioxydantes enzymatiques

(Blanine C.2006).

II.4.2. Systèmes antioxydants non enzymatiques

II.4.2.1. Glutathion

Le glutathion joue un rôle majeur dans la protection des lipides, des protéines et des acides nucléiques contre l'oxydation (Stamlev J.1996). En situation de stress oxydant, son rôle protecteur et détoxifiant résulte principalement de sa fonction de coenzyme des GSHPx.

Chapitre 2 : Stress oxydatif

Il fait aussi l'objet d'interactions synergiques avec d'autres composants du système de protection antioxydant tels que la vitamine C ou la vitamine E (**Goudable J.1997**).

II.4.2.2. Malondialdéhyde (MDA)

Le malondialdéhyde (MDA) est un produit de décomposition oxydative de lipides insaturés, comme produit secondaire du métabolisme de l'acide arachidonique. L'excès de MDA produit dans un tissu peut se combiner aux groupements aminés libres des protéines (essentiellement les résidus lysines), conduisant à la formation de produits d'addition susceptibles d'altérer les propriétés biologiques des protéines concernées. En outre, les protéines modifiées par le MDA sont immunogènes et peuvent conduire à la formation d'anticorps dirigés en particulier contre les résidus lysines modifiés par le MDA, comme il en a déjà été détecté chez l'homme, notamment en association avec la maladie cardiovasculaire (**Michel F. et al. 2008**).

II.4.2.3. Vitamine C (acide L-ascorbique)

La plupart des mammifères sont capables de synthétiser la vitamine C dans leur foie ou dans leurs reins. Ce n'est pas le cas de l'homme qui doit assurer un apport journalier d'environ 100 mg via une alimentation riche en fruits. La vitamine C est, avant tout, un excellent piègeur des EOA ($HO\bullet$ ou $O2\bullet-$). Elle inhibe également la peroxydation lipidique en régénérant la vitamine E à partir de la forme radicalaire issue de sa réaction avec des radicaux lipidiques. Ses fonctions sont nombreuses contribution au bon fonctionnement du système immunitaire, implication dans la synthèse du collagène et des globules rouges ainsi que dans les mécanismes de métabolisation du fer. (**Med liege R. 2007**).

II.4.2.4. Polyphénols

Les polyphénols sont un vaste groupe de molécules possédant plus de deux groupes aromatiques OH^- et au moins un noyau aromatique benzène. Les polyphénols peuvent inhiber la peroxydation lipidique et détruisent certaines espèces réactives telles que HO° et NO_2^- par abstraction d'un de leurs atomes d'hydrogène. Certains peuvent réagir directement avec l'ion superoxyde $O2^\circ-$. On a longtemps pensé qu'ils pouvaient être de bon chélateurs des métaux de transition, cela n'est peut-être pas vrai *in vivo* (**Benjamine D .2015**).

Chapitre 2 : Stress oxydatif

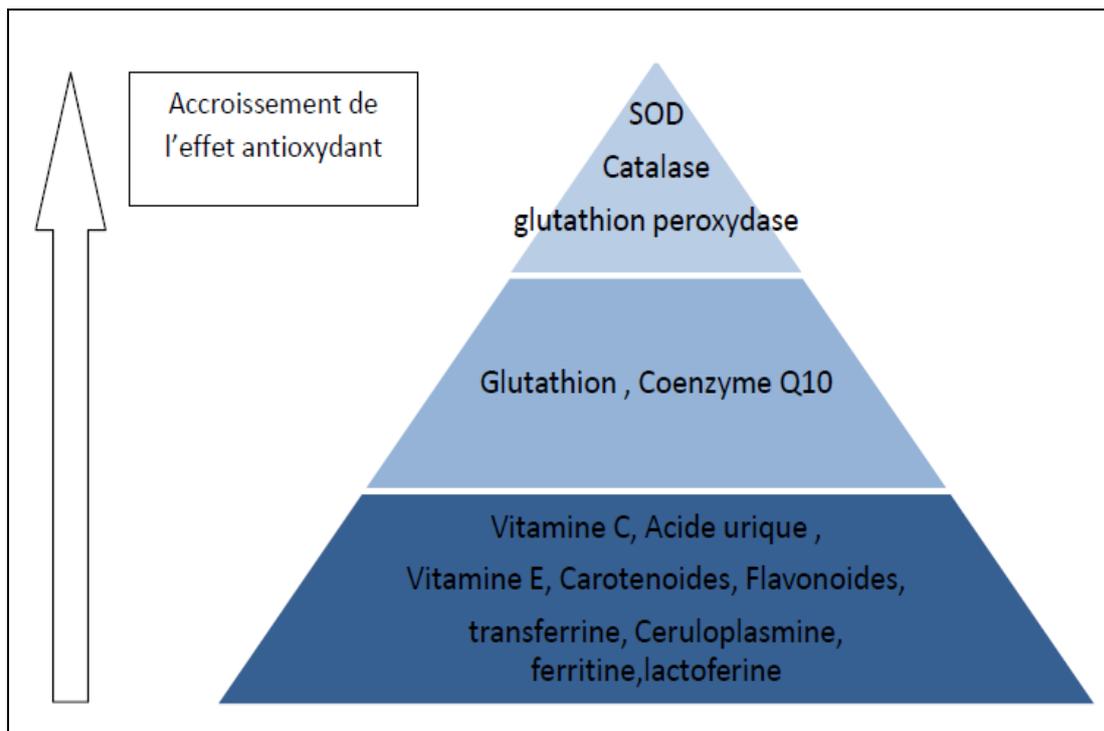


Figure 11 : Efficacité des divers antioxydants dans le corps humain en neutralisant les radicaux libres (Dasgupta et Klein, 2014).

Chapitre 3:

PUNICA GRANATUM

III. Grenade

III.1. La Généralité sur la grenade

Depuis des milliers d'années, le grenadier, *Punica granatum*L.1753, ses fruits ainsi que ses graines, son écorce et ses fleurs, sont utilisés, au Moyen-Orient et en Asie, régions dont cet arbuste est originaire, pour leurs propriétés médicinales. D'abord disséminé par les nomades arabes, puis introduit en Chine au début du IIème siècle avant JC, le grenadier est importé à Rome par les Romains de retour des guerres puniques, après leur victoire sur les Carthaginois. Plus tard, le grenadier sera introduit dans la péninsule ibérique, où le nom de son fruit, la grenade, sera donné à l'une des plus grandes villes d'Espagne (**Elodie W .1982**).

III.2. Nomenclature

Tableau 03: Les Nomenclatures de la *Punica granatum*L.1753

Nom scientifique	<i>Punicagranatum</i> L.1753
Nom italien	Melograno
Nom français	Grenadien
Nom anglais	pomegranate
Nom arabe	Romane
Nom espagnol	Granado

III.3. Origine géographique et aire de répartition du grenadien

Le grenadier est fortement représenté au Moyen-Orient, sa terre d'origine. Ainsi, on le trouve fréquemment en Afghanistan, Turquie, Transcaucasie, et en Inde. Il est aussi beaucoup cultivé dans le bassin méditerranéen en Espagne, Italie, Grèce, Algérie, Tunisie et Maroc. On lren contre déjà plus rarement dans le midi de la France, au Portugal, en Bulgarie et en Crimée. De même en Amérique, la culture du grenadier reste très sporadique. Il est présent en Californie, dans l'Utah, en Alabama, Louisiane et Floride (**Amouretti M. 1992**).

Chapitre 3 : Grenade

III.4. Classification de *Punica granatum*.L 1753

Tableau 04 : Classification de *Punica granatum* (Spichiger R.2004).

Règne	Planta
Embranchement	Spermaphytes
Sous-embranchement	Angiospermes
Class	Magnoliopsida
Ordre	Myrtales
Famille	Lythraceae
Genre	<i>Punica granatum</i> L. 1753

III.5. Caractères botaniques

Le grenadier, bien conduit entre en production a partir de la quatrième année. Il est déconseillé de cueillir par temps humide, car les fruits risquent également de se fendre. Selon les variétés, la période de maturité des grenades a lieu entre la fin du mois d'aout et de décembre (Hmid I.2014). *Punica granatum* L.1753 est une espèce à feuilles caduques, Elles sont de forme oblongues, opposées ou sous opposées, luisantes, étroites, entières et non stipulées, de 3 à 7cm de long et de 2cm de large selon les cultivars ; Au stade juvénile, les feuilles sont de couleur rougeâtre puis à la maturité, elles deviennent verdâtres (Douaouri N.2018). La période normale de la floraison de différents cultivars de grenadier se produit généralement entre mars- avril et juin- aout. Elle dure jusqu'à 10 –12 semaines et voire plus selon les variétés et les conditions géographiques. Sur le plan de la biologie florale, le grenadier est une espèce monoïque qui développe, sur le même arbre, des fleurs hermaphrodites fertiles en formes de «vase", et des fleurs males stériles avec un style très court et des ovaires atrophiés (en forme de cloche)(Hmid I.2014)



Figure 12 : Différentes parties du grenade (Hmid I.2014)

III.6. Propriétés pharmacologiques

Certaines études rapportent que l'écorce, les racines, les feuilles, les fleurs et le tronc ont des effets médicaux bénéfiques sur certaines pathologies, principalement dans la prévention et le traitement du cancer par l'inhibition des facteurs pro-inflammatoires et les initiateurs de la tumeur et réduisent également la prolifération cellulaire, les maladies cardiovasculaires (effet anti-athérogène), le diabète, la maladie d'Alzheimer, le Sida, la dysfonction érectile ainsi que des propriétés oestrogéniques. En médecine Ayurvédique, le grenadier est considéré comme « une pharmacie en soi », il est utilisé pour soigner les maladies gastro-intestinales et les affections parasitaires. L'écorce et les racines sont utilisées traditionnellement pour traiter la dysenterie, les diarrhées, les ulcères et pour traiter les aphtes buccaux. Ils sont connus aussi pour leurs propriétés astringentes, vermifuges et anthelminthiques. L'huile extraite de grenade peut efficacement interdire la production de prostaglandine ou de leucotriène par inhibition des enzymes eicosanoïdes de la cycloxygénase et de la lipoxigénase de sorte qu'elle peut augmenter l'application de l'huile ou de ses dérivés comme substances anti-inflammatoires internes ou externes **(Elodie W .1982)**.

Chapitre 3 : Grenade

Tableau 05 : Propriétés pharmacologiques des différentes parties du grenadien (Douaouri N. 2018).

Partie de la plante	Activité / effet	Résultats de l'étude
Feuilles	antidiabétique	L'extrait méthanolique des feuilles a montré un effet antidiabétique remarquable
Feuilles et écorces	Antidiabétique, hypolipédimique et antioxydant	Les feuilles et l'extrait de pelure de <i>Punica granatum</i> . possèdent des propriétés antidiabétiques, hypolipédimiques et antioxydantes significatives
Graines et écorces	Antidiabétique	L'extrait des graines et d'écorces a montré une réduction de l'augmentation de la glycémie induite par l'alloxane. L'extrait d'écorce a présenté une activité significativement meilleure que l'extrait de graines.
Fleurs	Protection contre la néphrotoxicité	L'extrait des fleurs du grenadier a un rôle protecteur et améliore la néphrotoxicité induite par la gentamicine
Supplément de grenade	Neuro-protecteur	Les enzymes liées à la membrane ont été modifiées dans les régions du cerveau de souris Tg2576 traitées avec un régime témoin, et la supplémentation en grenade rétablit les activités des enzymes à des niveaux comparables aux valeurs notées dans les contrôles
Ecorces	Protection contre la néphrotoxicité	L'administration d'écorce de fruits a montré une amélioration notable des anomalies liées à la néphrotoxicité.

Chapitre 3 : Grenade

III.7. Propriétés toxicologiques de *Punica granatum* L.1753

Tableau 06 : Les doses létal de la *Punica granatum* (extrait méthanolique) chez les rats et les souris

L'animal	Les rats		Les souris	
La voie	Voie oral	intra péritonéale	Voie oral	intra péritonéale
DL50	500mg/kg p.c.	217mg/kg p.c.	200mg/kg p.c.	187mg/kg p.c.
Référence	(Patel <i>et al.</i> 2008)		(Patel C, <i>et al.</i> 2008)	

III.8. Toxicité

L'écorce du grenadier, au XIXème siècle, souvent utilisée pour ses propriétés anthelminthiques, semble montrer quelques effets secondaires non négligeables. Ainsi, après administration d'une décoction d'écorce de racine, il fut observé, chez plusieurs patients, l'apparition de vertiges, d'étourdissements, d'une sorte d'ivresse, parfois des syncopes, et de légers mouvements convulsifs. Cependant, ces accidents étant fugaces et ne laissant aucune trace après leur manifestation, ils furent tolérés par les médecins de l'époque (**Cazin f. 1987**).

III.9. Composée phénolique de l'extrait

Les composés phénoliques (ou polyphénols) sont des molécules qui appartiennent au métabolisme secondaire. Les polyphénols constituent un groupe important de métabolites secondaires, environ 10 000 composés ont été caractérisés jusqu'à aujourd'hui. La plupart des molécules phénoliques sont formées à partir de deux acides aminés aromatiques la tyrosine et sur tout de la phénylalanine, les flavonoïdes et les tanins et alcaloïdes. Variables selon les parties du plant (**Macheix *et al.* 2005**). Les composés phénoliques interviennent dans un grand nombre de processus physiologiques chez la plante et dans les interactions avec leur environnement, leur structure leur conférant des fonctions très spécifiques (**Desjardins Y, 2008**).

Chapitre 3 : Grenade

Tableau 07 : Les composés phénoliques de *Punica granatum* L. 1753.

La classe chimique	Nom de composé	Partie de la plante	Référence
Acides] Hydrox benzoïques	Acide Gallique	Jus, Ecorce, Fruit	(Belkacem N, 2009)
	Acide Magique	Ecorce	
Acides Hydroxycinnamique	Acide Caféique	Jus, Ecorce	
Anthocyanes	Deiphinidine	Ecorce	
Flavonoïdes	Epicatchine	Jus, Ecorce	
	Kaempferol	Ecorce	
Les tanins	Puiucalin	Ecorce, Fruit, Feuille	
	Pedunculagine	Ecorce	
Les alcaloïdes	Peeiletierme	Ecorce, Racine	
Stérol	cholestérol	Ecorce	(Ephraïmet <i>al.</i> 2006)
Acide Hydroxydebenzioque	Acide gallique	Ecorce, Jus	

Partie Expérimentale

Materiel et Méthodes

Materiel et method

I. Matériel biologique

I.1. Animaux

Les animaux utilisés dans cette expérience sont des souris *Mus musculus* de la souche BALB/C, en nombre de 32 souris provenant de l'institut Pasteur, âgés de 02 à 03 semaines d'un poids moyen de 38g. Ce sont des mammifères de l'ordre des rongeurs. Largement utilisés dans divers domaines de la recherche (Tableau 5).

Tableau 08 : Classification des souris (Orsini et al. 1983).

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

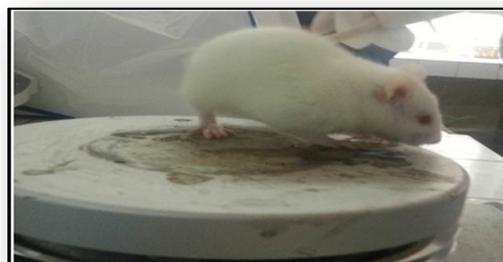


Figure 13: Les souris (BALB/C) (Photo personnelle) l'animalerie de faculté de la biologie université Tébessa (25/03/2019).

Materiel et method

II. Matérielle végétale

II.1. Réalisation de l'extrait hydrométhanolique de (*Punicagranatum*L. 1753)

II.1.1. Préparation

50 g	→	Ecorce.
150ml	→	Eau distillée.
350ml	→	Méthanol.

II.1.2. Protocole

Cet extrait nécessaire pour l'étude biologique est préparé comme suit:

50 g de poudre fine d'écorce de grenadien a été ajouté à 350 ml de méthanol dans un Erlenmeyer rodé et mélangé puis nous avons ajouté 150ml de l'eau distillée. Le mélange est porté sous macération pendant 2 h sous agitation. L'extrait obtenu est ensuite refroidi puis filtré à température ambiante, le filtrat est évaporé à sec à 46°C à l'aide d'un vaporisateur rotatif. Puis L'extrait est vidé dans une boîte de Pétri et placé dans l'étuve à 40°C pendant 48 h.



Figure 14: L'extraction de plant (*Punica granatum*L. 1753) (Photo personnelle) dans laboratoire de faculté de la biologie université Tébessa (16/03/2019).

II.1.3. Calcul le rendement

La calcul de rendement d'extrait brut selon la formule suivent :

$$RT = \frac{Bpe - Bpv}{PE} \times 100$$

RT(%)	→	Rendement
Bpe(g)	→	Boîte pétrie après extrait
Bpv(g)	→	Boîte pétrie vide
PE (g)	→	Poids d'extrait

Materiel et method

III .Matériels chimique

Tableaux 09 : Déférents pesticides utilisée.

	Les pesticides	
Produit	Deltaméthrine	Lambda cyhalothrine
Formulation	$C_{22}H_{19}Br_2NO_3$	$C_{23}H_{19}ClF_3NO_3$
Forme	Liquide	Liquide
Utilisation	Utilisée pour imprégner les moustiquaires	Utilisé en santé pour contrôler les cafards, les moustiques, et les mouches
Couleur	Blanc	Blanc

IV. Conditions d'élevage

Ces souris ont été soumis à une période d'adaptation de 15 jours, aux conditions de l'animalerie; à une température de 25°C et une photopériode naturelle. Les animaux étaient mis dans des cages spéciales à souris, celles-ci sont tapissées d'une litière constituée de copeaux de bois. Les cages on été nettoyées et la litière changée tous les jours jusqu'à la fin de l'expérimentation, et suivie l'alimentation spécifique (le pain) et l'eau était remplie dans des biberons.



Figure 15 :Conditions d'élevage des souris(Photo personnelle) dans l'animalerie de faculté de biologie d'université de Tébessa(25/03/2019).

Materiel et method

IV.1. Traitement des souris

Après une période d'adaptation de 15 jours nous avons commencé le traitement. Ces souris ont été réparties en (08) lots égaux à raison de (04) souris par lot, il s'agit

IV.2.Choix des doses

Pesticide 1 : Déltaméthrin(D) 8.69 mg/kg/j selon la (Samiran.et al.,2010).

Pesticide2: Lambda cyhalothrine(LCT) 1.56 mg /kg/j selon (Samiran,etal.2010).

Extrait : Solution d'extraction hydrométhanolique de la (*Punica granatum*) (E) 1.38mg/kg/j

(Mohamed el al. 2013).

Lots Témoin (T): Souris témoins ont reçu une eau physiologique par voie orale par jour pendant 15 jours.

Lot 2 Traité par(D):Souris ont reçu par voie orale (gavage) une concentration 50mg/kg/j pendant 15jours.

Lot 3 Traité par (LCT):Souris ont reçu par voie orale (gavage) uneconcentration 3.8mg/kg/j pendent 15 jours.

Lot 4 Traité par (E+D): Souris ont reçu par voie orale (gavage) une concentration 50 mg/kg/j de extrait, puis après 2h on traitement par le (D) uneconcentration 50mg/kg/j par voie orale pendent 15 jour.

Lot 5 Traité par (LCT+D): Souris ont reçu par voie orale une concentration 3.8mg/kg/j de (LCT), puis après 2h on traitement par le (D) une concentration 50mg/kg/jpar voie orale pendent 15 jour.

Lot 6 Traité par (E+LCT): Souris ont reçu par voie orale une concentration 50 mg/kg/jde extrait, puis après 2h on traitement par la (LCT) une concentration 3.8mg/kg/jpar voie orale pendent 15 jour.

Lot 7 Trait par (E) : Souris ont reçu par voie orale une concentration 50 mg/kg/jde extrait pendent 15 jour.

Lot 8 Trait par (E+L+D):Souris ont reçu par voie orale une concentration 50 mg/kg/j de extrait, puis après 2h on traitement par le (D+LCT) une concentration (D): 50mg/kg/j, et LCT :3.8mg/kg/j par voie orale pendent 15 jour.

Materiel et method



Figure 16 : Traitement des souris (Photo personnelles) dans l'animalerie de faculté de biologie d'université de Tébessa (27/03/2019).

IV.3. Mesure de poids(g)

La mesure de poids des souris est effectuée une fois chaque 3 jour pendant la durée de traitement, à l'aide d'une balance numérique.



Figure 17: Mesure de poids par la balance numérique (Photo personnelle) dans l'animalerie de faculté de biologie d'université de Tébessa (27/03/2019).

V. Sacrifices et extraction d'organes

Après 15 jours de traitement toutes les souris ont été sacrifiées par décapitation, puis le foie prélevé et pesé à l'aide d'une balance numérique et rincé avec sérum salin. Les organes ainsi récupérés ont été couverts avec du papier aluminium et stockés dans le congélateur (-80°C) pour les dosages ultérieurs des paramètres du stress oxydatif.

Materiel et method

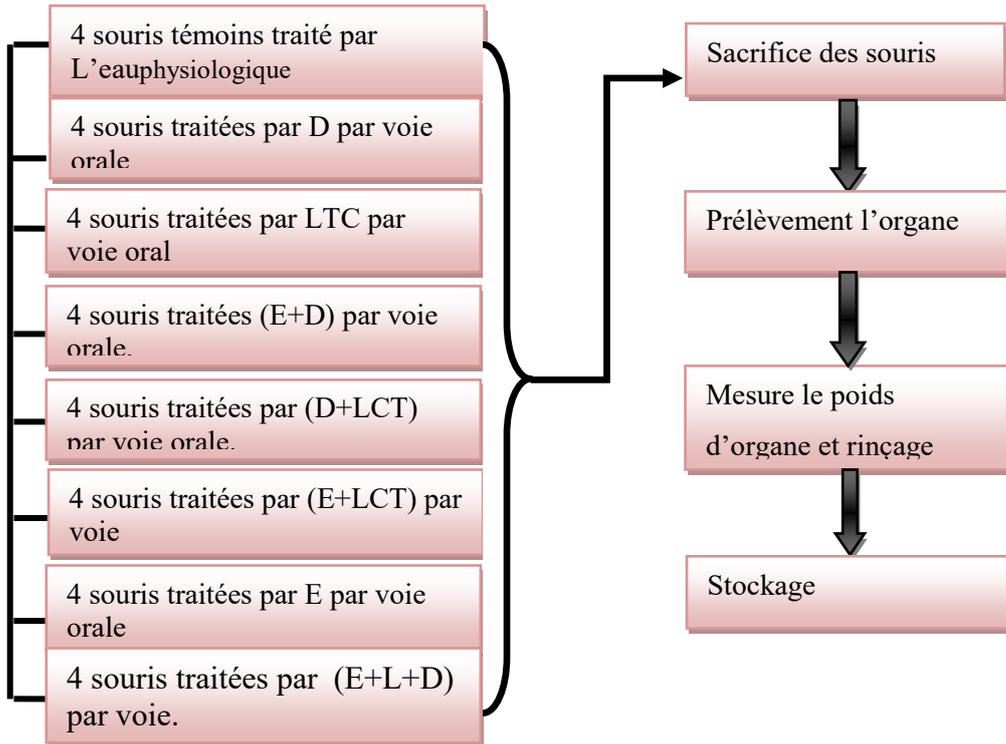


Figure 18 : Schéma récapitulatif la première parti de protocole expérimental.

V.1. Poids relatif du foie

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

$$\mathbf{PRF(\%) = \frac{Pf}{PT} \times 100}$$

$$\mathbf{PRF (\%) = PF/PT \times 100}$$

PF (g) → poids du foie.

PT(g) → poids total de souris.

VI. Le dosage

Après la première étape de l'étude, vient la phase d'évaluation des paramètres du stress oxydant

Materiel et method

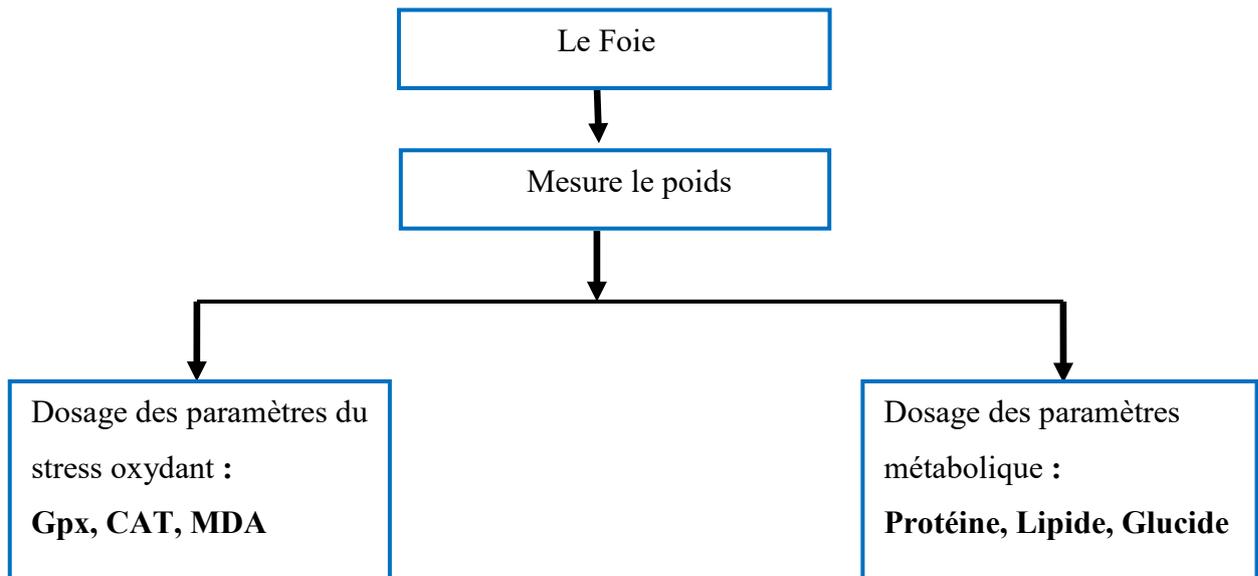


Figure 19 : Schéma récapitulatif deuxième parti de protocole expérimental.



Figure 20: Foie de la souris (Photo personnelle) (18/04/2019).

Materiel et method

VI.1. Préparation des solutions

VI.1.1 Préparation des solutions pour le dosage du stress oxydant

VI.1.1.1. Solution de dosage glutathion peroxydas (Gpx)

Tableau 10 : Protocole de dosage GPX.

Dosage de Gpx			
Protocole	GSH (Glutathion) (0.1 mM)	TCA (Tempo Céphaline Activée) (01 %)	DTNB(5.5'-Dithion-bis- (2-nitrobenzoic acid) (1.0mM)
	Prendre 3.073 mg de GSH dans 100 ml eau distillée	Dissoudre 01 g de TCA dans 100 ml d'eau distillée	Dissoudre 100 mg de DTNB dans 250 ml de méthanol absolu

VI.1.1.2. Solution de l'activité catalase (CAT)

Tableau 11: solution l'activité catalase (CAT).

Dosage de CAT		
	Solution (1)	Solution (2)
Protocole	Dissoudre 3.12 g de NaH₂PO₄ (monosodium phosphate) dans un 100ml de l'eau distillé, agiter la solution pendant 5 min	Prendre 7.16g de Na₂H₂PO₄ (phosphate monosodique) dans 100ml de l'eau distillé, agiter la solution pendant 5 min

Materiel et method

VI.1.1.3. Solution de dosage du (MDA) Malondialdéhide

Tableau 12 : Les solutions pour le dosage MDA.

Dosage de MDA				
Les solution	TBS :(Tris, NaCL)	TCA- BHT	Hcl (0,6 M)	Tris-TBA
Protocol	Dissoudre 0.878 g de NaCl dans 100ml d'eau distillée, puis 0.606 g Tris et agiter la solution ajuster le PH à 7.4	Prendre 20 g TCA dans 100 ml d'eau distillée pour obtenir TCA 20 % Dans un autre flacon prendre 01 g de BHT et ajouter la solution TCA 20% et agiter à chaud.	Prélever 5.156 ml d'Hcl et compléter le volume à 100 ml par l'eau distillée agiter la solution	0.3 g Tris dans 100 ml de l'eau distillée Dans un autre flacon prendre 1.73 g de TBA et ajouter la solution Tris (26 mM) avec l'agitation de solution

VI.1.2. Les solution de dosage métabolique

VI.1.2.1. La solution pour protéine

Tableau 13 : Solution de dosage pour la protéine.

Dosage de protein		
	BCA	BBC
Protocol	Dissoudre 05 mg de BSA dans 05 ml d'eau distillée.	Dissoudre 33.33 mg de BBC dans 16.66ml éthanol (95%) puis agiter pendant 02 Heures. Ajouter 33.33 ml d'acide ortho phosphorique (85%). Ajouter 333.333 ml d'eau distillée.

Materiel et method

VI.1.2.2. Les solutions pour les lipides

Tableau 14 : Préparation des solutions pour les lipides.

Les lipides		
	Solution(1)	Solution (2)
Protocol	Prendre 0.38g de l'acide Vallin. Puis ajouter 55ml de l'eau distillé. Ajouter 195 ml d'acide orthophosphorique à (85%). Et couvrir le flacon par papier aluminium.	Prendre 25 ml d'huile de table. Et ajouter 10 ml de solvant chloroforme/méthanol. et couvrir le flacon par le papier aluminium.

VI.1.2.3. Les solutions pour les glucides

Tableau 15 : préparation des solutions pour les glucides.

Les glucides	
Protocol	Dans un flacon mettons 150 mg d'anthrone. Ajouter 75 ml de l'acide sulfurique, Puis 25 ml de l'eau distillée. et couvrir le flacon par papier aluminium

VI.2. Préparation des échantillons

3.25g de foie a été homogénéisés dans 8 ml de solution de tampon (TBS ; pH7, 4) (Tempo phosphate saline) 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 protéine, lipides; glucide; MDA, CAT et l'activité enzymatique de GPX.

VI.2.1. Dosage des métabolites

VI.2.1.1. Dosage des protéines (mg)

La méthode utilisée pour le dosage des protéines est celle de Bradford (1976) qui utilise la BSA comme standard, sur le même échantillon utilisé pour doser les lipides.

Materiel et method

Protocole

On récupère le culot issu de la deuxième centrifugation auquel on a ajouté 1ml du NaOH (0.1N) et on agite énergiquement pour la dissolution des protéines. Après, on prélève, au moyen d'une micropipette, un volume de 100µl auquel on ajoute 4ml du réactif BBC (Bleu Brillant de Coumassie) (50mg BBC +50ml d'acide orthophosphorique à 85% et on complète à 500ml avec l'eau distillée).

Ainsi une couleur bleue se développe et on passe directement les échantillons pour lecture à une longueur d'onde 595nm.

VI.2.1.2. Dosage des lipides (mg)

Les lipides tissulaires sont évaluée selon la méthode (**Goldsworthy et al. 1972**), on utilise 200µl d'homogénat dans 5ml de l'acide trichloracétique 20% (TCA), on broyé et on filtre ce mélange ; et directement on applique une centrifugation à 5000t/min pendant 10min.

Protocole

Le culot est gardé dans tube contient 1ml du mélange Ether/Chloroforme, et après centrifugé ce mélange à 5000t/min pendant 10min, on prélève 100µl du surnageant, auquel on ajoute 1ml de l'acide sulfurique et on met après agitation les tubes dans un bain marie à 100°C pendant 10 min. Après refroidissement, on prélève encore une fois au moyen d'une micropipette 200µl de l'extrait auquel on ajoute 2.5ml du mélange sulfophosphanillinique à 85% (0.38g vanilline 195ml acide orthophosphorique et 55ml H_2O) et laisse ce mélange 30 min à l'obscurité, la lecture à une longueur d'onde 530nm.

VI.2.1.3. Dosage des glucides (mg)

Le dosage des glucides solubles totaux a été fait selon la méthode de Dubois, (1956). L'extraction des sucres solubles consiste à mettre 100µl d'homogénat dans des Tubes à essai puis à ajouter 2ml d'éthanol à 80%, le tout est laissé 48h.

Protocole

Le dosage se fait par évaporation totale de l'alcool en mettant les tubes à essai dans un bain marie à 70°C. Après refroidissement, on complète le volume de chaque tube à essai à 20ml avec de l'eau distillée ensuite on prélève 1ml de la solution et on ajoute 1ml de phénol à 5% en prenant soin de bien agiter. Puis on ajoute 2ml d'acide sulfurique concentré dans des tubes déposés préalablement dans un bain de

Materiel et method

glace. Enfin le tout est laissé se reposer pendant 25min, puis on procède à la lecture à une longueur d'onde de 490nm.

2.2. Évaluation des paramètres du stress oxydant

VI.2.2.1. Dosage de glutathion peroxydase (GPx) ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$)

L'activité enzymatique de la GPx est mesurée par la méthode de Flohe et Gunzler (1984), en utilisant H_2O_2 comme substrat. Un volume de 0.2ml de cytosol. Est récupéré dans un tube contenant 0.4ml de GSH 0.1mM et 0.2ml de tampon phosphate 0.067M, pH7.8.

Protocole

Le mélange est incubé au bain marie à 25°C pendant 05min, ajouter 0.2ml de H_2O_2 (1.3 mM) pour initier la réaction. Après 10min 1ml de TCA 1% (acide tri chloro-acétique) est rajouté dans le but d'arrêter la réaction et le mélange est mis dans la glace pendant 30min et centrifugé durant 10min a 3000t/mn. Un volume de 0.48 ml de surnageant est placé dans une cuve auquel on ajoute 2.2ml de $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4$ 0.32M avec 0.32ml de DNTB 1Mm. Ce mélange formé un composé coloré et sa densité optique est mesurée à 412nm chaque 30sec pendant 05min.

Expression des résultats

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

$$\text{GPx } (\mu\text{mol GSH mg de protéine}) = \left[\left(\frac{\text{DO}_{\text{échantillon}} - \text{DO}_{\text{étalon}}}{\text{DO}_{\text{étalon}}} \right) \times 0.04 \right] \times 5 \text{ mg de protéine}$$

DO échantillon \longrightarrow Densité optique de l'échantillon.

DO étalon \longrightarrow Densité optique de l'étalon.

0.04 \longrightarrow Concentration de substrat (GSH).

VI.2.2.2. Dosage MDA ($\mu\text{mol}/\text{mg}/\text{min}$)

Le dosage du MDA est réalisé selon la méthode (Esterbauer et al. 1992). Peut être détecté par une réaction colorimétrique à l'acide thiobarbiturique (TBA). La détection du MDA issue de la dégradation des acides gras polyinsaturés à 3ou 4 double liaisons peroxydées, constitue une méthode très sensible pour déterminer une lipoperoxydation in vitro.

Materiel et method

Principe

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

Protocole

Prélever 375 µl de l'homogénat (surnageant), ajouter 150 µl de la solution TBS (tris 50mM, Na cl 150mM pH7), puis on ajoute 375 µl de la solution TCA-BHT (TCA 20%, BHT 1%), et vortexer et centrifuger à 1000 tour/min pendant 10 min, Après le vortex, prélever 400 µl du surnageant et ajouter 80 µl du HCL 0.6 M. Puis ajouter 320 µl de la solution tris-TBA (tris 26mM, TBA120mM), puis incuber le mélange au bain marie à une température de 80°C pendant 10 minutes, et à en fin la mesure l'absorption dans une spectrophotométrie à 530nm.

Expression des résultants

La concentration de MDA a été déterminée en utilisant le coefficient d'extinction moléculaire du MDA ($a = 1,53 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Les résultats ont été exprimés en ($\mu\text{mol} / \text{mg}$).

$$\text{MDA } (\mu\text{mol} / \text{mg de protéine}) = (\text{DO échantillon} / 1.53 \cdot 10^5) / \text{mg de protéine.}$$

VI.2.2.3. Dosage l'activité Catalase(CAT) ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$).

Le dosage spectrophotométrique de l'activité catalase (CAT) est réalisé suivant la méthode de (Cakmak et Horst 1991). Pour un volume final de 3ml, le mélange réactionnel contient : 100 µl de l'extrait enzymatique brut, 50 µl de peroxyde d'hydrogène H_2O_2 à 0,3% et 285 µl de tampon phosphate (50mM, pH 7,2). L'étalonnage de l'appareil se fait en l'absence de l'extrait enzymatique. La réaction est déclenchée par l'addition d'eau oxygénée.

La décroissance de l'absorbance est enregistrée pendant trois minutes par un spectrophotomètre pour une longueur d'onde de 240nm et un coefficient d'extinction linéique molaire $\epsilon = 39400 \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{L}$.

Materiel et method

Expression de l'activité enzymatique

L'activité enzymatique de la catalase est calculée selon la formule suivante :

$$\text{Act} = \Delta \text{Abs} \times V_r \times 1000 / \Delta t \times \epsilon \times V_s \times P$$

Act: activité enzymatique en ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$) de protéines.

ΔAbs : différence moyenne de l'absorbance par minute.

V_r : Volume réactionnel (ml).

V_s : volume de l'extrait protéique (ml).

P : teneur en protéines totales en mg.

Δt : temps de lecture en minute.

E : coefficient d'extinction molaire de H_2O_2 ($30 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

A_λ : l'absorbance ou la densité optique (sans unité) de la solution pour une longueur d'onde λ .

C : est la concentration de l'espèce absorbante (H_2O_2).

L : est la longueur du trajet optique en cm.

$\epsilon = A_\lambda / LC$.

RESULTATS ET DESCUSSION

Résultats et discussion

I. Résultats

I.1. Rendement

Application numérique :

$$RT = \frac{31.69 - 30.58}{50} \times 100$$

$$RT = 2.22 \%$$

I.2. Effets des pesticides et de la (*Punica granatum L.1753*) sur les paramètres de la croissance globale des souris.

Les résultats obtenus lors de l'évaluation des paramètres de croissance en terme du gain de poids et le poids relatif durant les 15 jours de traitement des différents groupes de souris par la lambda cyhalothrine et le Deltaméthrine, *Punica granatum* et leur mixture sont illustrés par les figures.

I.2.1. Gain de poids (GP)

Les résultats de l'évaluation du gain de poids, présentés dans la figure, montrent une diminution significative ($p \leq 0,05$) du poids corporel chez les groupes de souris traités par la LCT, la D et aussi leur combinaison et le mixture E+D+LCT par rapport au groupe témoin. Ce résultat est presque identique pour le lot traité par l'extrait (**fig21**).

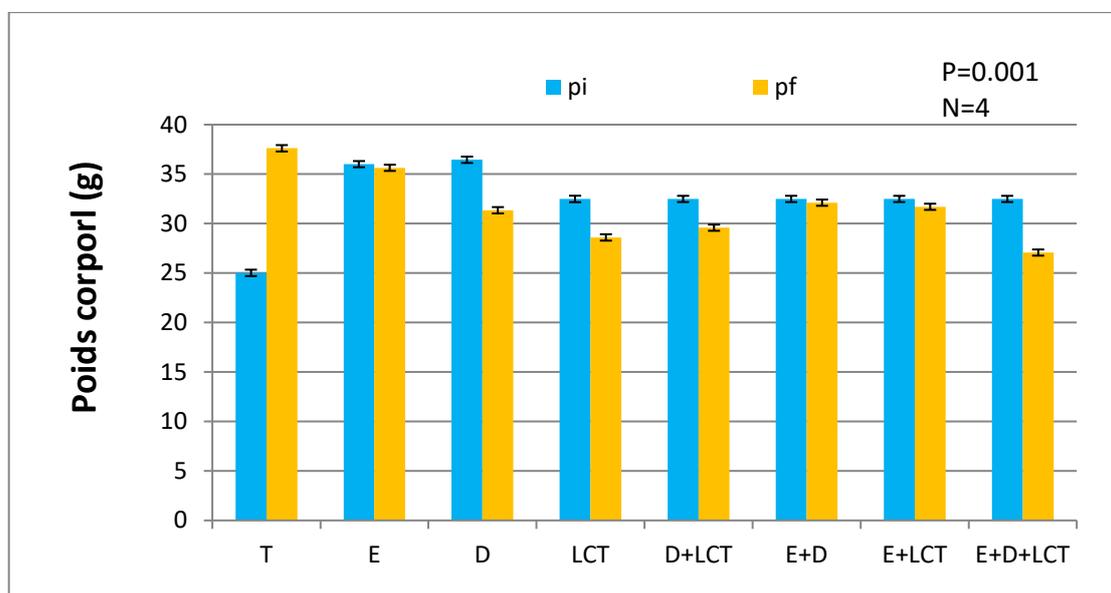


Figure 21: Poids initial des souris au début de traitement et le poids final à la fin de traitement.

T:témoin D: deltaméthrine Lct: lambda cyhalothrine E:extrait (*punica granatum*).

Résultats et discussion

N : le nombre des souris dans chaque lot **P** : Les moyennes affectées par des lettres différentes sont statistiquement différentes. Chaque valeur représente la moyenne \pm ESM. Cette analyse est complétée par le test de Tukey afin de classer et comparer les moyennes deux à deux. Les moyennes indiquées par des lettres différentes (a, b, c, d...) sont très hautement significativement différentes ($P < 0,001$).

Pi: Poids initial **pf**: Poids final.

La figure (22) montre que le lot traité par la *Punica granatum* a enregistré le gain de poids le plus faible suivi par le lot témoin. Ces résultats montrent aussi une diminution significative ($p \leq 0,05$) de GP chez les souris traitées par D et LCT et aussi leur combinaison et la mixture E+D+LCT par rapport au groupe témoin.

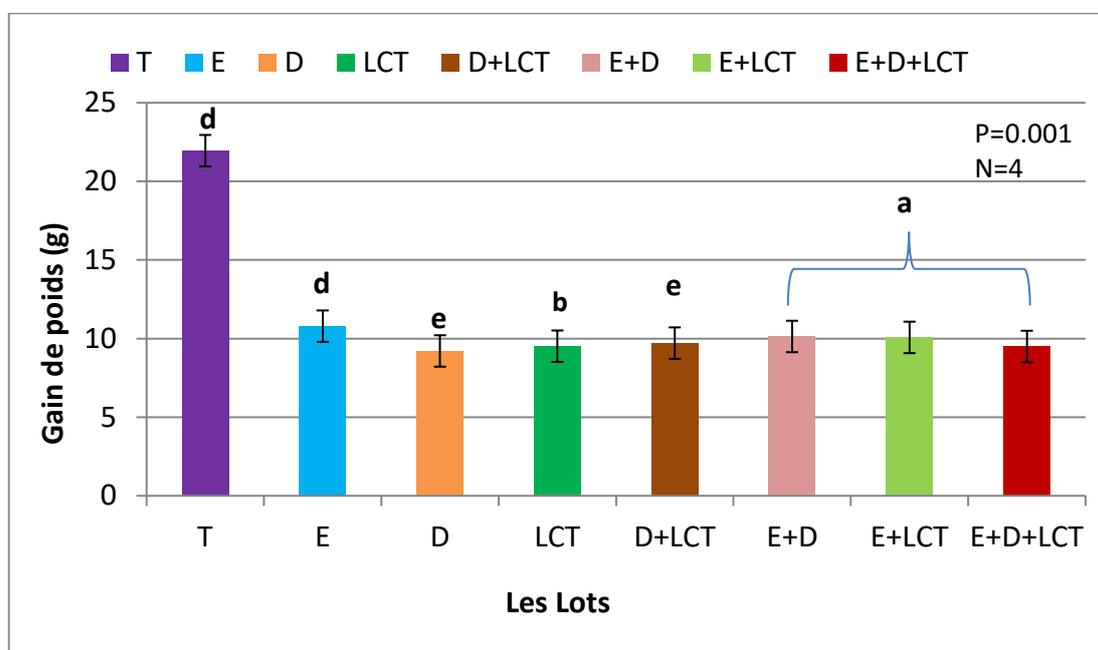


Figure 22: Evolution du gain de poids corporel (GP) chez les souris témoins et traités après 15 jours de traitement par les pesticides et *Punica granatum* L.1753.

T: témoin **D**: deltaméthrine **Lct**: lambda cyhalothrine **E**: extrait (*punica granatum*).

N : le nombre des souris dans chaque lot **P** : Les moyennes affectées par des lettres différentes sont statistiquement différentes. Chaque valeur représente la moyenne \pm ESM. Cette analyse est complétée par le test de Tukey afin de classer et comparer les moyennes deux à deux. Les moyennes indiquées par des lettres différentes (a, b, c, d...) sont très hautement significativement différentes ($P < 0,001$).

Résultats et discussion

I.2.2. Poids relatif du foie (PRF)

Les résultats obtenus suite à l'évaluation du PRF montrent une augmentation très hautement significative ($P \leq 0,001$) du poids relatif du foie chez le groupe traité par la D, LCT et D+LCT et E aussi en comparaison avec le groupe témoin, par contre le traitement des animaux par le mixture E+D+LCT a donné des résultats similaires par rapport au lot témoin (figure 23).

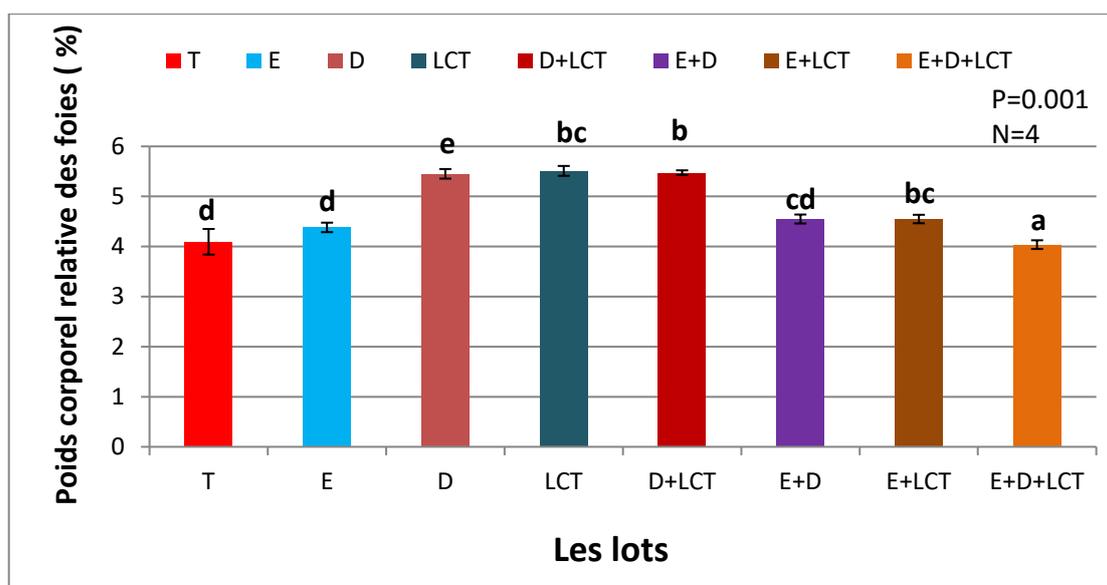


Figure 23 : Evolution du poids relatif du foie (PRf) chez les animaux après 15 jours de traitement par les pesticides et la *Punica granatum*.

T:témoin **D:** deltaméthrine **Lct:** lambda cyhalothrine **E:**extrait (*punica granatum*).

N : le nombre des souris dans chaque lot **P :** Les moyennes affectées par des lettres différentes sont statistiquement différentes. Chaque valeur représente la moyenne \pm ESM. Cette analyse est complétée par le test de Tukey afin de classer et comparer les moyennes deux à deux. Les moyennes indiquées par des lettres différentes (a, b, c, d...) sont très hautement significativement différentes ($P < 0,001$).

I.3. Étude des paramètres biochimiques et enzymatiques

I.3.1. Effet des pesticides et *Punica granatum* sur les paramètres biochimiques au niveau hépatique chez les souris

I.3.1.1. Taux des protéines

Les résultats obtenus montrent une diminution très hautement significative ($p \leq 0,001$) du taux des protéines totales du foie chez le lot D et D+LCT et le lot E+D et E+LCT

Résultats et discussion

comparés au témoin. Ces mêmes résultats montrent également un état de stabilité dans la teneur cytosolique en protéines chez les lots traités par E, LCT et mixture E+D+LCT, par rapport au groupe témoin (fig.24).

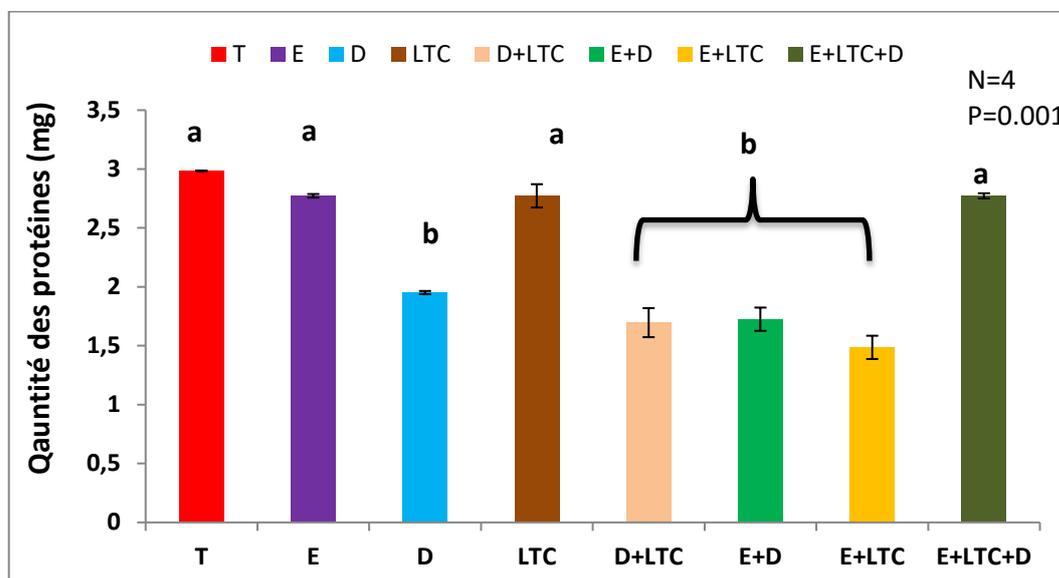


Figure 24 : Variation de teneur en protéines (mg) du foie chez les souris traitées durant 15 jours de traitement.

T:témoin D: deltaméthrine Lct:lambda cyhalothrine E:extrait (*punica granatum*).

N : le nombre des souris dans chaque lot P : Les moyennes affectées par des lettres différentes sont statistiquement différentes. Chaque valeur représente la moyenne \pm ESM. Cette analyse est complétée par le test de Tukey afin de classer et comparer les moyennes deux à deux. Les moyennes indiquées par des lettres différentes (a, b, c, d...) sont très hautement significativement différentes ($P < 0,001$).

I.2.1.2. Taux des lipides

Une diminution très hautement significative ($p \leq 0,001$) du taux des lipides du foie chez le lot D et D+LCT et le lot E+D et E+LCT comparés au témoin. Ces mêmes résultats montrent également un état de stabilité dans la teneur de lipide chez les lots traités par, LCT par rapport au groupe témoin (fig.25).

Résultats et discussion

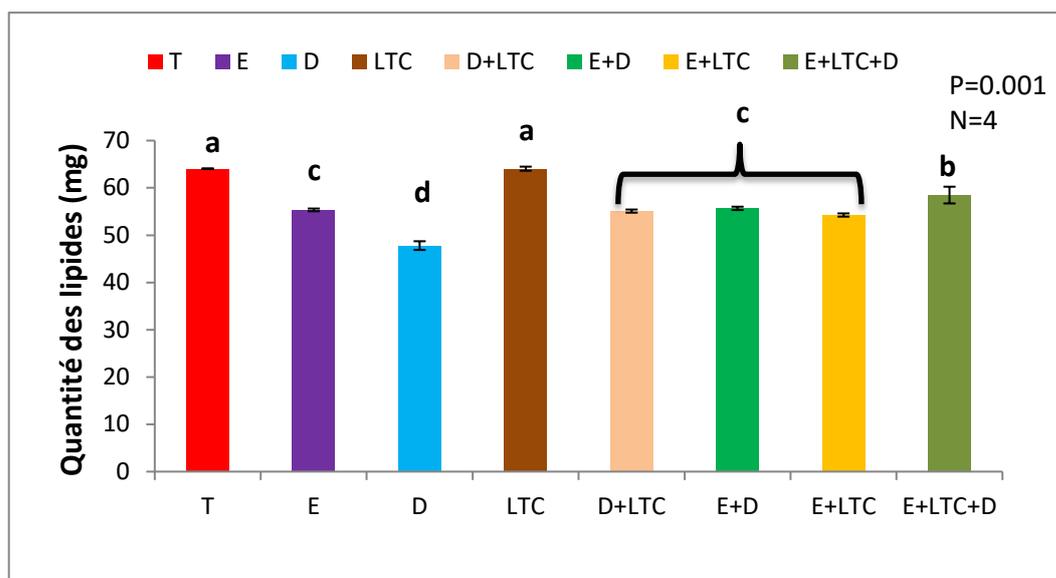


Figure 25 : Variation de teneur en lipides (mg) du foie chez les souris traités durant 15 jours de traitement.

T:témoin **D:** deltaméthrine **Lct:** lambda cyhalothrine **E:**extrait (*punica granatum*).

N : le nombre des souris dans chaque lot **P :** Les moyennes affectées par des lettres différentes sont statistiquement différentes. Chaque valeur représente la moyenne \pm ESM. Cette analyse est complétée par le test de Tukey afin de classer et comparer les moyennes deux à deux. Les moyennes indiquées par des lettres différentes (a, b, c, d...) sont très hautement significative différentes ($P < 0,001$).

I.2.1.3. Taux des glucides

Les résultats présentés une diminution très hautement significative ($p \leq 0,001$) du taux des glucides du foie chez le lot D et D+LCT et le lot E+D et E+LCT et mixture comparés au témoin. (fig 26).

Résultats et discussion

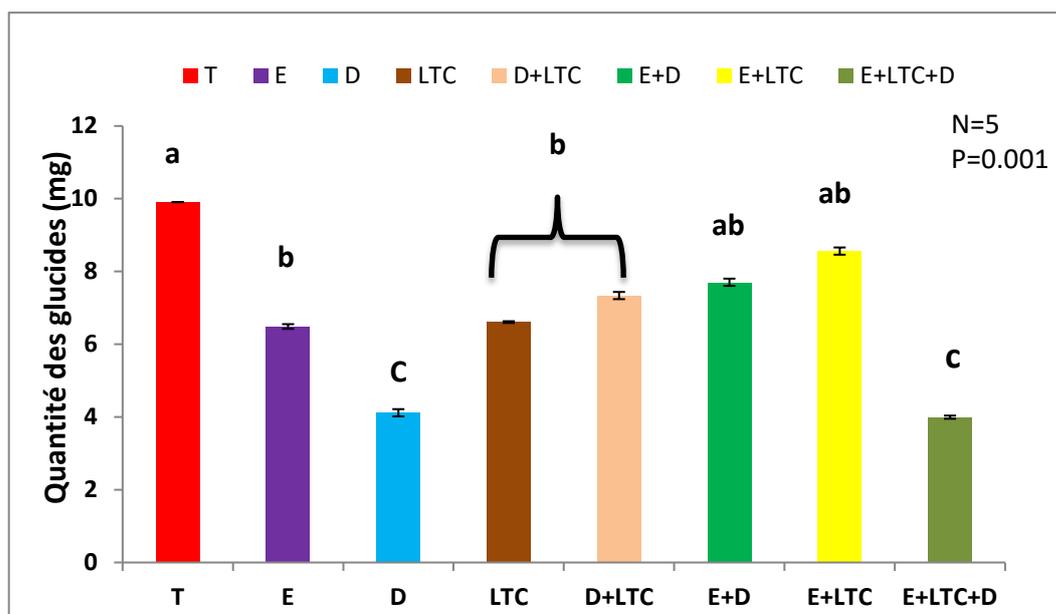


Figure 26 : Variation de teneur en glucides (mg) du foie chez les souris traitées durant 15 jours de traitement.

T:témoin D: deltaméthrine Lct: lambda cyhalothrine E:extrait (*Punica granatum*).

N : le nombre des souris dans chaque lot P : Les moyennes affectées par des lettres différentes sont statistiquement différentes. Chaque valeur représente la moyenne \pm ESM. Cette analyse est complétée par le test de Tukey afin de classer et comparer les moyennes deux à deux. Les moyennes indiquées par des lettres différentes (a, b, c, d...) sont très hautement significativement différentes ($P < 0,001$).

I.2.2. Effet des pesticides et la *Punica granatum* sur les paramètres enzymatiques chez les souris.

I.2.2.1. Effet des pesticides et la *Punica granatum* sur les variations de l'activité de la glutathion peroxydase GPx

Une augmentation très hautement significative ($p \leq 0,001$) de l'activité de GPx chez les lots traités par, D et E+D, E+LCT par rapport au groupe témoin. Par contre, les résultats montrent une variation très hautement significative chez les autres groupes traités (fig27).

Résultats et discussion

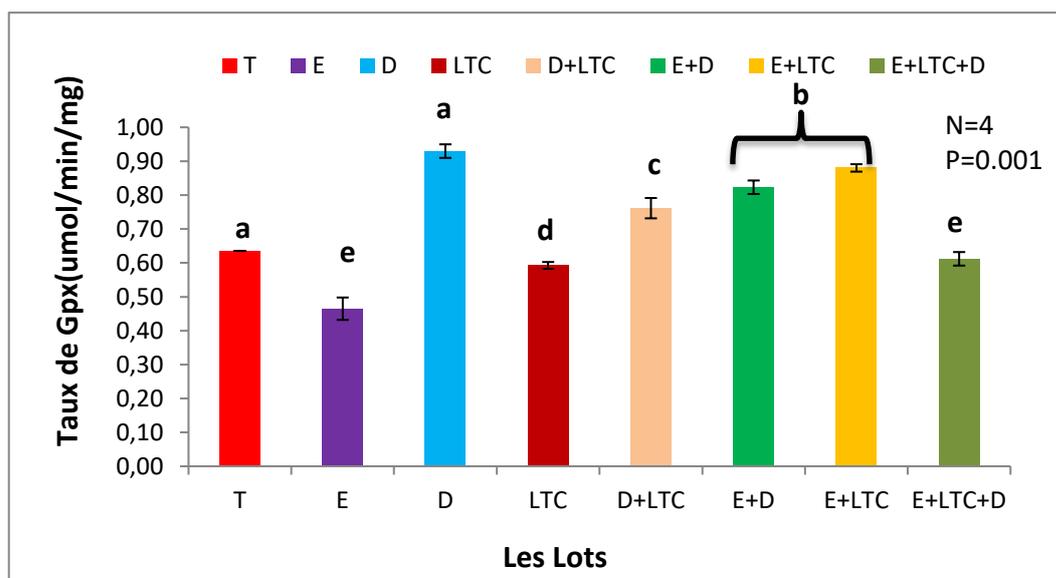


Figure 27: Taux de GPx (nmol/min/mg) chez les souris traitées durant 15 jours par les pesticides et la *Punica granatum*.

T:témoin **D:** deltaméthrine **Lct:** lambda cyhalothrine **E:**extrait (*Punica granatum*).

N : nombre des souris dans chaque lot **P :** Les moyennes affectées par des lettres différentes sont statistiquement différentes. Chaque valeur représente la moyenne \pm ESM. Cette analyse est complétée par le test de Tukey afin de classer et comparer les moyennes deux à deux. Les moyennes indiquées par des lettres différentes (a, b, c, d...) sont très hautement significativement différentes ($P < 0,001$).

I.2.2.2. Effet des pesticides et la *Punica granatum* sur la teneur de malondialdéhyde (MDA)

Nos résultats montrent une augmentation très hautement significative ($p \leq 0,001$) du taux de MDA cytosolique chez les groupes traités par la D, E+D, et E+LCT, par rapport au groupe témoin. Par contre, les résultats montrent une diminution très hautement significative chez les autres groupes traits par E, LCT, D+LCT et la mixture (fig28.).

Résultats et discussion

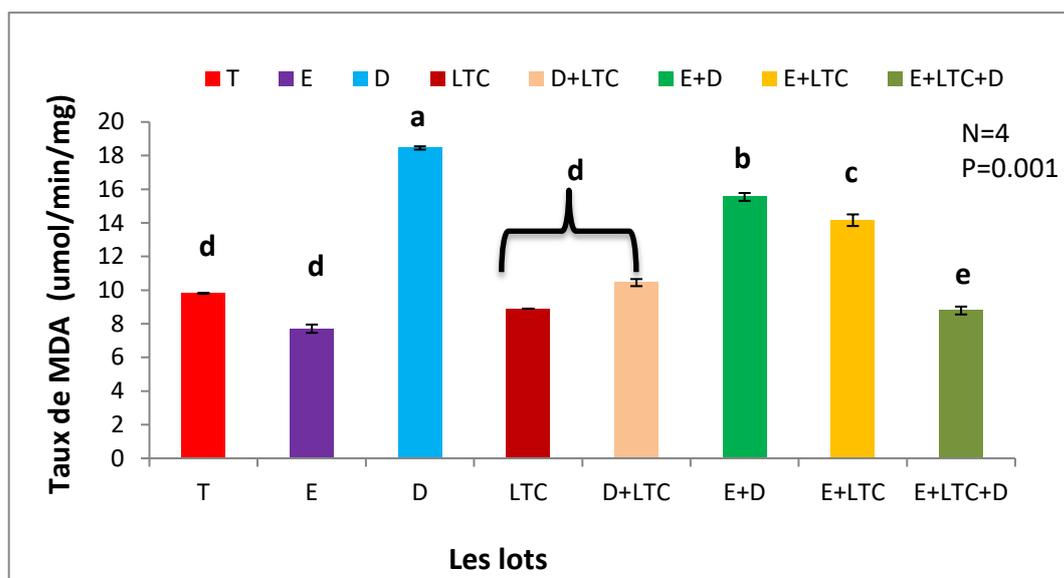


Figure 28 : Taux de MDA ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protéine) chez les souris traités durant 15 jours par les pesticides et la *Punica granatum*.

T: témoin **D:** deltaméthrine **Lct:** lambda cyhalothrine **E:** extrait (*punica granatum*).

N : le nombre des souris dans chaque lot **P :** Les moyennes affectées par des lettres différentes sont statistiquement différentes. Chaque valeur représente la moyenne \pm ESM. Cette analyse est complétée par le test de Tukey afin de classer et comparer les moyennes deux à deux. Les moyennes indiquées par des lettres différentes (a, b, c, d...) sont très hautement significative différentes ($P < 0,001$).

I.2.2.3. Effet des pesticides et la *Punica granatum* sur la teneur de catalase (CAT)

Les résultats représentés montrent une diminution très hautement significative ($p \leq 0,001$) du taux de CAT du foie chez le lot D et le lot E+D, E+LCT et la mixture comparés au témoin. Ces mêmes résultats montrent également un état d'augmentation très hautement significative ($p \leq 0,001$) chez le lot LCT par rapport au groupe témoin (fig 29).

Résultats et discussion

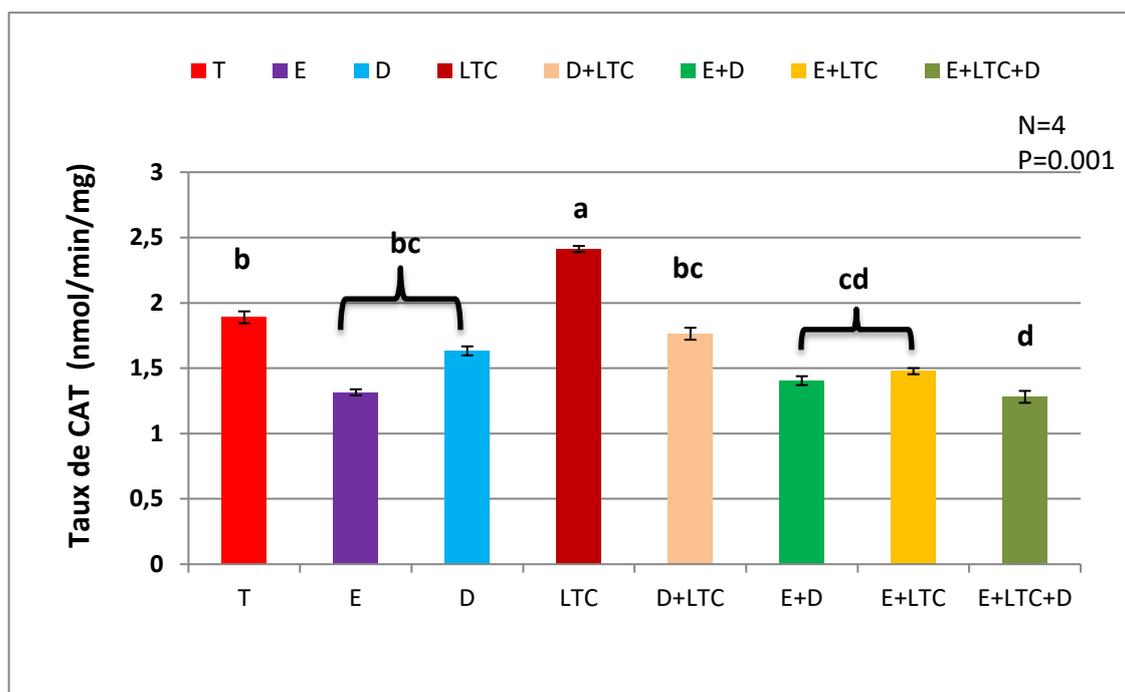


Figure 29 : Taux de CAT (nmol/min/mg) chez les souris traités durant 15 jours par les pesticides et la *punica granatum*.

T:témoin **D:** deltaméthrine **Lct:** lambda cyhalothrine **E:**extrait (*Punica granatum*).

N : le nombre des souris dans chaque lot **P :** Les moyennes affectées par des lettres différentes sont statistiquement différentes. Chaque valeur représente la moyenne \pm ESM. Cette analyse est complétée par le test de Tukey afin de classer et comparer les moyennes deux à deux. Les moyennes indiquées par des lettres différentes (a, b, c, d...) sont très hautement significative différentes ($P < 0,001$).

Résultats et discussion

II. Discussion générale

Les effets toxiques de pesticides étudiés sur le système hépatique ainsi que l'effet protecteur de la (*Punica granatum*) contre la toxicité de ces xénobiotiques ont été mises en l'évidence par l'investigation des paramètres métaboliques, paramètres enzymatiques, non enzymatique et les paramètres de croissance. Cette étude nous a permis d'illustrer les relations entre l'exposition aux pesticides et les effets toxiques qu'ils induisent en fonction de la matrice d'exposition au niveau de foie.

Le foie est un organe très sensible qui joue un rôle majeur dans la maintenance et la performance d'homéostasie dans notre corps. C'est le principal organe où les processus importants comme le métabolisme et la désintoxication ont lieu. Ainsi, le foie est l'organe le plus exposé aux dommages en raison de l'exposition chronique à la drogue, les toxiques environnementaux et autres xénobiotiques (**Zimmerman et Ishak, 1994; Lewis, 2004**).

La Deltaméthrine est un pyréthrine synthétique qui a été utilisé pour lutter contre les infestations parasitaires de nombreuses cultures telles que le coton, le café, la tomate et les céréales. Il est également largement utilisé dans les programmes de lutte anti vectorielle. C'est un des groupes d'insecticides les plus efficaces contre les moustiques vecteurs du paludisme (**Husain et al., 1994; Juliet et al., 2001; Kowalczyk - Bronisz et al., 1990; LukowiczRatajczak et Krechniak, 1992; Mestres et Mestres, 1992**).

Le Lambda cyhalothrine, est un pyrétrinoïde d'une très grande activité. Il est efficace à des taux d'application très faible. Une étude comparative de l'efficacité des insecticides de la famille pyrétrinoïdes, réalisée sur une variété de tissus, après 2 mn d'exposition, a démontré que la lambda cyhalothrine assomme mieux *Anophelesgambiae* que la perméthrine (**Vythilingham et al., 1999**).

Le grenadien, *Punica granatum*, anciennement connu et apprécié de toutes les civilisations par sa beauté et la jutosité de son fruit antique doté de riches applications ethno-médicales (**Shah et al. 2011; Chadli et al. 2015**). Les fruits du grenadier, avec leurs graines, écorces, fleurs et jus, ont été consommés durant des milliers d'années, en tant que nourriture et remèdes (**Holland et al. 2009; Smith, 2014**). Il est présent dans les anciens textes grecs, égyptiens, les textes bibliques, le Coran et dans les traditions populaires des différents pays bordant la Méditerranée.

Résultats et discussion

Le contenu des métabolites principaux (protéines, glucides, lipides) sont des bio marqueurs jouent un rôle essentiel particulièrement dans la reproduction et le développement. Les protéines ont un rôle fondamental dans l'organisme de toutes les espèces biologiques vivantes connues (**Lewis, 2004**). Ces dernières entrent dans divers réactions et peuvent assurer la catalyse biochimique, la régulation hormonale et s'intègrent dans la cellule en tant qu'éléments structuraux en même temps que les glucides et les lipides (**Jacobe et al. 1961**).

Le stress oxydant qui résulte d'un déséquilibre entre la production des radicaux libres et leur élimination par les défenses anti oxydantes, contribue à l'initiation et à la progression de plusieurs maladies. Les radicaux libres sont très réactifs et peuvent attaquer, s'ils ne sont pas détruits, différentes cibles telles que les protéines, l'ADN et surtout les acides gras poly insaturés (peroxydation lipidique) (**Bonne font Rousselot et al. 2000; Sharma et al. 2000**). La cellule a plusieurs façons d'atténuer les effets du stress oxydatif, soit en réparant les dommages (nucléotides endommagés et peroxydation lipidique par les produits), soit en réduisant directement l'état pro-oxydatif par l'intermédiaire d'antioxydants enzymatiques et non enzymatiques. Les antioxydants non enzymatique, vitamine E et C, urate, mélatonine, etc. et enzymatiques; superoxyde dismutase (SOD), glutathion peroxydase (GSH-Px) et catalase (CAT) etc. ont été montrés pour piéger les radicaux libres et les ROS (**Karaöz et Karaöz, 1992 ; Reiter, 1993 ; Stephen et al. 1997**).

II.1. Effets des pesticides et la *punica granatum* sur les paramètres de la croissance globale

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

Résultats et discussion

son pouvoir antioxydant en normalisant l'homéostasie redox intracellulaire et le rétablissement de l'état psychique des animaux (*Cliona et al. 2011; Toumi et al. 2013*).

Nos résultats de l'évaluation du PRf montrent une augmentation significative du poids relatif du foie chez le groupe traité par la DM, LTC et leur mixture.

II.2. Effets des pesticides et *Punica granatum* sur les paramètres métaboliques chez les souris

Nos résultats montrent une diminution très hautement significative dans les paramètres métaboliques chez les souris traitée par les deux pesticides et l'extrait, par rapport lot témoin. Le taux de protéine diminuée est expliqué en l'occurrence par une dénaturation protéique mais aussi par la diminution de la synthèse des protéines due à l'atteinte au système transcription-traduction au niveau cellulaire. Une autre explication serait l'utilisation excessive des molécules protéique impliquées dans la défense anti-oxydante contre les ROS libérées suite à la consommation des différents xénobiotiques.

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

II.3. Effets des pesticides sur l'activité de GPx au niveau de foie chez les souris.

Nos résultants montrent une augmentation de l'activité de glutathion peroxydase (GPx) très hautement significative, dans le lot traité par le deltaméthrine et lambda cyhalotrine par rapport au témoin, ceci est dû à l'augmentation de la quantité des radicaux libres au niveau tissulaire et cellulaire hépatique. Contrairement à une autre étude où les auteurs sont prouvés également que l'activité de Glutathion peroxydase (GPx) hépatiques a diminué significative chez les souris traitées par la deltaméthrine (*Hasibur et al. 2006*).

Résultats et discussion

II.4. Effets des pesticides sur l'activité de catalase (CAT) au niveau de foie chez les souris

L'activité de catalase (CAT) dans le foie de souris traitées par la deltaméthrine présente une diminution très hautement significative par rapport au témoin;(Mohamed, 2016) a rapporté des résultats similaires à ceux que nous avons trouvés. CAT ont diminué dans le groupe intoxiqué par DLM (deltaméthrine) chez les souris comparativement au groupe témoin normal, le tissu hépatique après administration de DLM (deltaméthrine). Toutes ces altérations révèlent la présence de DLM (deltaméthrine) stress oxydatif hépatorénal et cérébral résultant d'une consommation excessive la production de ROS

L'activité de catalase(CAT) dans les lots traités par la lambda cyhalothrine montrer une augmentation très hautement significative par rapport le lot de témoin cela explique diminution d'une consommation ROS. Les résultats obtenus par (Fetoui H, et al. 2011) ont également montré augmentation au niveau d'activités CAT dans le traitement au LTC (lambda cyhalothrine) chez les *rats wister*, les groupes peuvent impliquer la dismutation de l'anion superoxyde O_2^- et la décomposition de H_2O_2 et peut représenter un aspect de la réponse cellulaire augmentation des niveaux de ROS induits par la toxicité des LTC.

II.5. Effets des pesticides sur le malondialdéhyde (MDA) au niveau de foie chez les souris

Le taux de MDA dans le foie chez les souris traitée par deltaméthrine représenté une augmentation très hautement significative, par rapport lot témoin. Alors il ya une autre étude qui présente les mêmes résultats, le foie de souris MDA augmenté, tandis que le GSH dans les tissus, GSH-PX, SOD et CAT ont diminué dans le groupe intoxiqué au deltaméthrine Les espèces d'oxygène réactif (ROS) sont constamment produites à l'intérieur de l'appareil chez les souris(Ahmed M.et al. 2016).Et l'activité de MDA chez les souris traitée Lambda cyhalothrine montrer une diminution très hautement significative, par rapport les souris témoin, Cela explique il n'ya pas peroxydation lipidique, et dans une autre étude mais défèrent animal (*les rats wister*) a provoqué une augmentation significative de la liaison hépatique MDA, Le foie du rat traité par LTC a inhibé de nombreuses évacuations, l'infiltration cellulaire et l'infiltration de l'eau dans les cellules (Mohamed M et al. 2010).

Résultats et discussion

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

Pour la majorité des paramètres étudiés, un apport en extrait d'écorce de grenadier (*Punica granatum*) chez les souris traitées par les deux pesticides étudiées a amélioré le statut Redox des animaux en rétablissant un certain équilibre des métabolites primaires mais aussi des biomarqueurs enzymatiques et non-enzymatiques explorés. Ceci peut être expliqué par la richesse des écorces de grenadier en polyphénols, molécules dotées d'un immense pouvoir anti-oxydant, dû essentiellement à la présence des fonctions hydroxyle sur le noyau benzène de ces composés phénoliques. Les polyphénols qui sont des molécules exclusivement d'origine végétale sont à la bases de la conception de la plupart des préparations médicamenteuses et ce aux vertus de leurs activités biologiques diverses. Dans notre étude ils ont démontré un fort pouvoir thérapeutique contre l'intoxication aux produits phytosanitaires à savoir la deltamethrin et lambda cyhalothrine.

conclusion

CONCLUSION

Le deltaméthrine et lambda cyhalothrine sont des pesticides utilisés à grand échelle, et un grand nombre d'humains et animaux y sont exposés. Avec cette étude, nous nous sommes intéressés à l'étude des effets de ces deux produits phytosanitaires sur le système hépatique chez les souris par administration orale. Pour atteindre notre objectif nous nous sommes procédé à une série d'analyse de paramètres de croissance (poids relatif et gain de poids), enzymatiques (GPx) et (CAT), biomarqueurs de peroxydation lipidique (MDA), et sur les métabolites (protéines, glucide et lipide) sur des souris pendant 15 jours de traitement par gavage avec des doses de 3,8mg /kg/j pour lambda cyhalothrine, 50mg /kg/j pour le deltaméthrine et 50mg/kg/j pour l'extrait de *Punica granatum*.

A la lumière des résultats obtenus nous avons constaté une diminution significative des indicateurs de croissance tels que le poids corporel et des paramètres biochimiques (protéines, glucides et lipides) et l'activité catalase (CAT), avec une augmentation de l'activité enzymatique de GPx et de MDA qui est un biomarqueur de peroxydation lipidique. Nos résultats indiquent que ces deux pyréthrinoïdes peuvent causer de multiples troubles hépatiques chez les souris. L'extrait hydrométhanolique de *Punica granatum* était en partie capable de rétablir l'équilibre en terme de certains biomarqueurs biochimiques enzymatiques et non-enzymatique de stress oxydant. Cette capacité à corriger les troubles causés au niveau hépatique par une exposition à deux xénobiotiques chimiques confirme l'utilité de produits naturels d'origine végétale à agir comme élément protecteur contre la toxicité provoquée par les produits phytosanitaires chez les mammifères et leur potentielle utilisation dans des formulations visant à atténuer les conséquences d'une éventuelle exposition à de tels composés dangereux.

En perspectives, il sera souhaitable de développer cette recherche par :

- Étude histopathologie.
- Développer cette étude et l'appliquer à l'homme pour connaître les effets produits par ces pesticides et les éviter grâce à un traitement par des plantes telles que la grenadine.

Référence

Bibliographie

Références bibliographiques

Références bibliographiques

A

A. Favier, 2006 (Stress oxydant et pathologies humaines) 2006. Elsevier Masso SAS. Tous droits réservés Ann Pharm. Fr 2006, 64 : p 390-396.

Abdelfattah El Feki, and MongiSaoud, Histopathological, oxidative damage, biochemical, and genotoxicity alterations in hepatic rats exposed to deltamethrin: modulatory effects of garlic (*Allium sativum*)

Abderrahim Lomri (Radicaux libres dérivés de l'oxygène et superoxydes dismutases : acclimatées. Editions de l'envol.1989 pages. Pages 497-501.acid. Exp ToxicolPathol, p:189-196 69668 .2008.08.002

Amourettim.C., Comet G. Cahier d'histoire des techniques Anadon, A., Martinez, M., Martinez, M. Diaz, M. J. et Martinez-Larranaga, M. R.

Anand Mohan, Abid A, Ansari. 2014. Systematic review on parathyroid toxicity anciens. Publications de l'université de Provence. 1992. 174 pages. Page 81.

Ansari, R. W., Shukla, R. Yadav, R. Seth K., Pant A. Singh, D. Khanna, K. (2012). Involvement of dopaminergic and serotonergic systems in the neurobehavioral toxicity of lambda cyhalothrin .2012.02.012

ANSES. 2010. Agence nationale de sécurité sanitaire, de l'alimentation, de l'environnement et du travail. Co-exposition des professionnels de la lutte antivect oriel eau Dee et aux insecticides. Avis de l'anse et de l'AFSSAPS. Rapport d'expertise collective. Septembre 2010.

B

Baog A, Wang MH, William LC, Dao JC, Zheng JS. 2007. Risk assessment of lambda cyhalothrin on aquatic organisms in paddy field in China. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, p: 47

Barr, D. B., Olsson, A. Wong, L. Udunka, S., Baker, S. E., Whitehead, R. Needham, L. (2010). Urinary concentrations of metabolites of pyrethroid insecticides in the general U.S. population: National Health and Nutrition Examination Survey 1999-2002.

Beaudeau Jean, Louis, Durand Geneviève : Biochimie médicale - Marqueurs actuels et perspectives. Médecine sciences publications / LAVOISIER, Année 9/2011 .Page 115.

Belkacem N.2009 Contribution à l'étude des propriétés antidiabétiques de *Punica granatum*L. (grenadien) chez le rat diabétique, Université Abou Bekr Belkaïd –Tlemcen, 2009. binding. Anal Biochem 72:248–254.biologiques et pathologiques. Paris : Lavoisier, 2005 : p 1-23.

Blandine Garait : Le stress oxydant induit par voie métabolique (régimes Bradberry, S. Cage S. Proudfoot A. et Vale, J. (2005).

Références bibliographiques

Bradford M (1976) A rapid and sensitive method for the quantities.

C

Camille Savary Étude de la toxicité chronique et du potentiel cancérigène de contaminants de l'environnement séparément et en mélange sur les cellules Hepa R université de Rennes1(2014).

Carnevale P., 1998. Impact de la résistance d'*Anopheles gambiae* S.S.

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

Carole Ichai, Hervé Quintard; Jean-Christophe Orban « Désordres métaboliques

Casida JE, Gammon W., Glickman Ah. Lawrence LJ., 1983. Mechanisms of selective action of parathyroid insecticides; Annu. Rev. Pharmacol Toxicol. 23 413-438.

CAZIN F.J. - Traité pratique et raisonné des plantes médicinales indigènes.

Charlier(4), J.P. Chapelle: (Le stress oxydant) (628-638) page (630-631). Chez le rat *wistar* : Aspects Biochimique et Histologique.) 2009 (1-105).

Chiali FATIMA ZOHRA : Effets métaboliques d'un régime à base de purée de pomme de terre contaminée par les pesticides chez le rat;11;13-159(2013;2014)

Cliona M., et al., 2011. «Strain differences in the neurochemical response to chronic restraint stress in the rat: relevance to depression». PharmacolBiochemBehav 97: 690-699. contrôle central de l'osmorégulation) 2011-1-172 page 36.

CPP (Comité de la prévention et de la précaution) (2002) Risques sanitaires liés à l'utilisation des produits phytosanitaires. Ministère de l'écologie et du développement durable. Rapport. 47 p.cytochrome p 450.

D

Danilo A, Fabiana V, Silvana G, Roberto D, 2007. Development of an analytical

Darriet F, Guillet P, Nguessan R, Doannio J., Koffi A, Konan L

Delattre JB, Bonne fontn , Rousselot D., Radicaux libres et stress oxydant. Aspects (Deltamethrine) et la prévention de cette toxicité par la quercétine chez le rat 9-134 des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance

Desjardins, Y. 2008. Physiological and ecological functions and biosynthesis of
doi: 10.1016/j. 14.01.2006.

DOUAOURI Nor El Houda Contribution à une étude phytothérapeutique,

Anti-inflammatoire et antioxydante du grenadien (*Punica granatum*L.1753). Etude in vivo 2018.

Références bibliographiques

Dr-Benjamin DUBOIS 2015(Implication du stress oxydant dans plusieurs affections du cheval athlète : revue bibliographique.

Dr-Fahima KLIBET : Impact du sélénium sur le stress oxydatif induit par l'arsenic.

Dubois M (1956) Colorimetric method for determination of sugars. Pubs économique. 192 p.

E

Elodie waldl grenadien(*Punica granatum*) : plante historique et évolutions thérapeutique .université henripoincaré - nancy 1 faculté de pharmacie 2009.

Ephraim P. Lansky, Robert A. Newman b : *Punica granatum*(pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer,2006.

Esterbauer H, Gebicki J, Puhl H, Jungens G, 1992.The role of lipid et réanimation de la physiopathologie au traitement », Springer-Verlag France, Examination Survey 1999-2002. *Environ Health Perspect* 742-748.

F

Fetoui H, Garoui et Zeghal, (2009). Lambda cyhalothrin induced biochemical and histopathological changes in the liver of rats: ameliorative effect of ascorbic acid

Exp :ToxicolPathol, 189-196. 10.1016/j.etp.2008.08.

Fetoui H, Mohamed Makni 1, Garoui 1, Najib Zeghal Toxic effects of lambda-cyhalothrin, a synthetic pyrethroid pesticide, on rat kidney : Involvement of oxidative stress and protective role of ascorbic acid Hamadi.

Flohe G (1984) Analysis of glutathione peroxidase. Methods Enzymol.

G

Gasmi.S;,(2018).Neurotoxicité de deux pesticides Université de Tébessa 2018.

H

H Fetoui, F Fakhfakh and L Keskes, Caffeic acid and quercetin protect erythrocytes against the oxidative stress and the genotoxic effects of lambda cyhalothrin in vitro October, 2014.

Hamadi Fetoui, El Mouldi Garoui, Lambda cyhalothrin induced biochemical and histopathological changes in the liver of rats: Ameliorative effect of ascorbic acid 2008.

Harouna E, evaluation de l'efficacité de la lambda cyhalothrine en pulvérisation intradomiciliaire dans les cercles de Koulikoro et de bla au mali;18-57(2010)

HasiburRehman, Mehboob Ali, FahimAtif, Manpreet Kaur 2018.

Références bibliographiques

Hasibur Rehman, Al Thbiani Aziz, Shalini Saggi, Zahid Khorshid Abas, Chen S., Zhang Z., Sun J. 1989. Clinical manifestations and diagnosis of acute parathyroid poisoning. *Arch Toxicol* 63: 54-58

Health promoting compounds in fruit and vegetables (Tomas-Barberan

Hmid ilhem Contribution a la valorisation alimentaire de lagrenade marocaine (*punicagranatum l.*) : caractérisation physicochimique, biochimique et stabilite de leur jus frais'Université Beni Mellal (Maroc) et l'Université d'Angers (France)2013.

Hossain, M, Suzuki T, Sato I, Takewaki, T, Suzuki K. ET Kobayashi H. (2005) insecticides in the general U.S. population: National Health and Nutrition.

Husain et al ., 1994; Juliet et al. 2001, Kowalczyk , Bronisz et al., 1990; **Lukowicz Ratajczak et Krechniak,** 1992; Mestres et Mestres, 1992).

Husain R, Malaviya M, Seth PK, Husain R. 1994 Effect of deltamethrin on regional brain polyamines and behaviour in young rats. *Pharmacol. Toxicol.* 74, 211–215.

I

INERIS : Institut national de l'environnement industriel et des risques (2005) Détermination des pesticides à surveiller dans le compartiment aérien : approche par hiérarchisation. Rapport. p 16.

IPCS INCHEM. 1990. Deltamethrin. Environmental health criteria EHC 97.WHO.

J

Jacob R.A. 1995. The integrated antioxydant system.Nutres. 755-66pp.

Joelle Goudable 1, Alain Favier (Radicaux libres oxygénés et antioxydants) Kanchan Bhatia, Sheikh Raisuddin, The modulatory effect of deltamethrin on antioxidants in mice.

K

Khanna,V. (2012). Involvement of dopaminergic and serotonergic systems in tenure obehavioral toxicity of lambda cyhalothrin in developing rats.*ToxicolLett*, 211(1), 1-9. 2012.02.12.

L

Lawan SM., Guangue K, Thiam D, Thiam M. 2007. Guide pour la communauté pour la protection de la santé et de l'environnement. Pesticide Action Network (PAN) Africa. 55 (2):8-18.Weinberg, J., 2009. Un guide pour les Organisation non gouvernementale (ONG) sur les pesticides dangereux et l'approche stratégique de la gestion internationale des produits chimiques (SAICM) : Un cadre d'action pour la protection de la santé humaine et de l'environnement contre les pesticides dangereux. p58.

Références bibliographiques

Lewis H. 2000. Drug-induced liver disease. *Med Clin of North Amer.* 84: 1275–311pp.
lieux, analyse des causes et des conséquences. Thèse de doctorat en pharmacie Université
Victor Segalen– Bordeaux 2, 115p.

M

M. Ronald St-Louis (Implication des espèces réactives de l’oxygène dans le

M. Zhao, Y. Zhang, W. Lius. *Gan. Environ. Toxicol. Chem.* 27 (2008) 1194–1200. 7 Dogan,
S. Nurten, M. Erkan. *Scientia*

Macheix, J, Fleuriet, A, Jay Allemand 2005. Les compose phénoliques

**MarwaNcir, Ghada Ben Salah, Hassen Kamoun, Fatma MakniAyadi, Abdelmajid
Khabir,** *Med.* pp: 13, 341.

Medjdoub. Amel : Evaluation des effets métaboliques d’un gavage par les pesticides
(Mancozèbe, Métribuzine) chez le *rat Wistar*.6;19-132(2012;2013) metabolism of pyrethroid
pesticides by rat and human hepatic microsomes and microgram quantities of protein utilizing
the principle of protein. p 15

**Mohamed Abdeldaim , Badr E. El Bialyb, Haidy G. Abdel Rahman, Abeer M. Radid,
Hany A. Hefnye, Ahmed M. Hassanf:** Antagonistic effects of *Spirulina platensis* against
sub-acute deltamethrin toxicity in mice : Biochemical and histopathological studies 2016.

Mohamed Dkhil Effect of Pomegranate (*Punicagranatum L.*) Juice and Methanolic Peel
Extract on Testis of Male Rats· October 2013.

Morgan, M. Mac Millan, K Zehr, et Sobus, J. (2016). Pyrethroid insecticides

N

Najiba Zeghal, Mohamed Makni 1, ElMouldi : Garoui Toxic effects of lambda cyhalothrin, a
synthetic pyrethroid pesticide, on the rat kidney: Involvement of oxidative stress and
protective role of ascorbic acid 2010.

Needham, L. (2010). Urinary concentrations of metabolites of pyrethroid neurobehavioral
toxicity of lambda cyhalothrin in developing rats. *Toxicol Lett*, Neuro mechanical effects of
pyrethroids, allethrin, cyhalothrin and deltamethrin on *Nutr Clin Mdtabol* 1997; 11:115-20.

O

.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. Oxidative stress biomarkers of exposure to
deltamethrin in freshwater fish, *Channa* Oxidative stress biomarkers of exposure to
deltamethrin in freshwater fish, *Channa*.

Références bibliographiques

P

P G C Campbell, Francine Denizeau, Emilien Pelletier « Écotoxicologie moléculaire : principes fondamentaux et perspectives de développement », Sainte-Foy, Que. : Presses de l'Université du Québec, 2004 .Page :182. p (8-21).

Patel C. Joby jacob, Augustine amalraj, studies on the toxicity of punica granatum L1753. puniceae whole fruit extract journa of ethno pharmacologie b295 - 300.2004. perméthrine et à la deltaméthriue sur l'efficacité des moustiquaires imprégnées. MédecineTropicale, 58, 349-354. Also issued in French, pp. 17 and English, pp. 20 as document WHONBC/99.1002 and WHO/MAL/99.1088. World. Health Organization, Geneva. peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. Free Radic. Biol.

Perrine.Branchet; Caractérisation de l'impact des activités humaines sur la pharmacology, 71(5), 657-669. plantes à fleurs. Une approche phylogénétique nouvelle des Angiospermes des pp.1-64. pyrethroids. *Toxicol Rev*, 24(2), 93-106. qualité de la ressource en eau en milieu urbain Sub- Saharien : étude de la contamination du bassin versant de la Méfou (Région Centre du Cameroun) par les pesticides et les résidus pharmaceutiques 7;10-223(2018). régions tempérées et tropicales. Editions Presses polytechniques et related disease. *Nutr Rev* 1996; 54: 1-30.

R

Rev Med Liege 2007, J. Haleng (1), J. Pincemail (2), J. Defraigne (3), C.

Rey R. 2012. La disparition des abeilles (Colony Collapsus Disorder). Etat des rôle dans les maladies rhumatismales) *Revue du Rhumatisme* 74 (2007) (636–643) page 638.

Ross, M. K., Borazjani, A., Edwards, C. C. et Potter, P. M. (2006). Hydrolytic metabolism **Sayed I, Parvez S, Pandey S, Bin-Hafeez B, Haque R, Raisuddin S., 2003.**

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

S

Scollon, E. J., Starr, J. M., Godin, S. J., DeVito, M. J. et Hughes, M. F. (2009). In vitro metabolism of pyrethroid pesticides by rat and human hepatic microsomes and cytochrome p 450 isoforms. *Drug Metabolism and Disposition*, 37(1), 221-228. **Bradberry, S. M., Cage, S. A., Proudfoot, A. T. et Vale, J. A. (2005).** Poisoning due to pyrethroids. *Toxicol Rev*, 24(2), 93-106.

Spichiger R.-E., Savolainen v., et al. Botanique systématique, 2004.

Références bibliographiques

Stamler JS, Slivka A. Biological chemistry of thiols in the vasculature and in vascular the cholinergic processes in rat brain. *Life sciences*, 77(7), 795-807. universitaires romandes. Troisième édition. 2004. Page 413.

V

Vectore K. (2012). Involvement of dopaminergic and serotonergic systems in the

Valéry Afonso, Romuald Champy, Dragoslav Mitrovic, Pascal Collin,

Vegetable products, Wood head Publishing, Cambridge, Angleterre,

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

W

Wasim AKTAR, Dwaipayan, Sengupta D, Ashim B, Chowdhur Y; Impact of pesticides use in agriculture : their benefits and hazards; *nterdisc Toxicol.* 2009; Vol. 2(1): 1–12. doi: 10.2478/v10102-009-0001-7 with special reference to deltamethrin, 62p.

Z

Zimmerman H.J., Ishak KG. 1994. Hepatic injury due to drugs and toxins. In: MacSween R.N.M., Anthony P.P., Scheuer P.J., Burt A.D., Portmann B.C. editors. *Path of the liver*. Edinburgh: Churchill Livingstone. 563–633pp.



ANNEXE

Annex

Matériels de traitement

- | |
|--|
| <ul style="list-style-type: none">- Les flacons- Les pavettes- Les ligands- Balance- Les micropipettes |
|--|

Matériels de dissection et de décapitation :

<ul style="list-style-type: none">- Ciseaux- Epingles- Papier absorbant- Couteaux- Pincés- Pavettes- Aiguille droite- Boites	<ul style="list-style-type: none">- Pince- gants de ménage- Planche de dissection- Lames de rechange pour Scalpel- Papier aluminium- Scalpel- Balance de précision (PHILIPS précision).
---	---

Matériels et Appareils utilisée :

Grande appareils	Petit appareils
<ul style="list-style-type: none">➤ Centrifugeuse (SELECTA)➤ Balance de précision (KERN)➤ Agitateur magnétique (WITEG)➤ Réfrigérateur➤ Bain marie (MEMMERT)➤ Agitateur Vortex (THERMOS)➤ Spectrophotomètre (UV mini 1240, SHIMADZU)	<ul style="list-style-type: none">➤ Tubes à essai➤ Tubes secs en verre et en plastique➤ Cuves pour la spectrophotométrie➤ Papier d'aluminium➤ Verre de montre➤ Micropipettes (10µl à 5000µl)➤ Eprouvettes graduées➤ Erlen meyers

Annex

<ul style="list-style-type: none">➤ Etuve (HERAEUS)➤ Bain sable➤ Mortier + Pilon (Broyeur manuel)	<ul style="list-style-type: none">➤ Papier absorbant➤ Micropipettes (10µl à 5000µl)➤ Pissette➤ Spatule➤ Portoirs➤ Entonnoirs➤ Becher➤ Papier absorbant
---	---

Matériels chimiques :

<ul style="list-style-type: none">➤ Acide sulfurique➤ GSH➤ H₂O₂➤ Acide orthophosphorique (à 85 %)➤ HCl➤ NaOH➤ BSA (Albumine sérum de boeuf)➤ CDNB➤ DTNB (l'acide 5-5'-dithio-bis-2-nitrobenzoïque)➤ Eau distillée	<ul style="list-style-type: none">➤ ASS (Acide sulfosalicylique)➤ BBC (Bleu Brillant de Coomassie)➤ NaCl➤ BHT (Butylhydroxytoluène)➤ Méthanol absolu➤ EDTA (Acide éthylène diamine tétracétique)➤ TBA➤ TCA (Trichloro acétique)➤ Tris
--	---

2. Les courbes d'étalonnage pour les dosages des métabolites

2.1. Courbe d'étalonnage pour dosage de protéine :

Tableau: Réalisation de la courbe d'étalonnage pour dosage des protéines

Tubes	1	2	3	4	5	6
Solution mère (BSA)	0	20	40	60	80	100
Eau distillé (µl)	100	80	60	40	20	0
Réactif BBC (ml)	4	4	4	4	4	4

Tableau: réalisation de la gamme d'étalonnage pour les protéines.

Tubes	0	1	2	3	4	5
DO	0	0,204	0,496	0,771	0,996	1,1

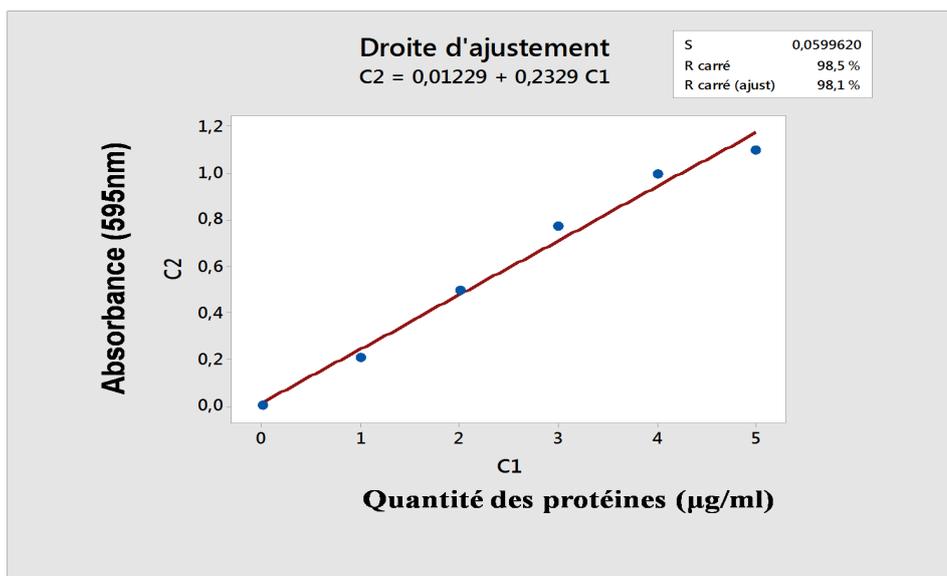


Figure: courbe d'étalonnage des protéines.

Annex

2.2. Courbe d'étalonnage pour dosage de lipide :

Tableau: Réalisation de la courbe d'étalonnage pour dosage des lipides.

Tubes	0	1	2	3	4	5
Solution mère (lipide) (µl)	0	20	40	60	80	100
Solvant éther/chloroforme (µl)	100	80	60	40	20	0
Réactif SPV (ml)	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5

Tableau: réalisation de la gamme d'étalonnage pour les lipides.

Tubes	0	1	2	3	4	5
DO	0	0,205	0,512	0,722	0,962	1,101

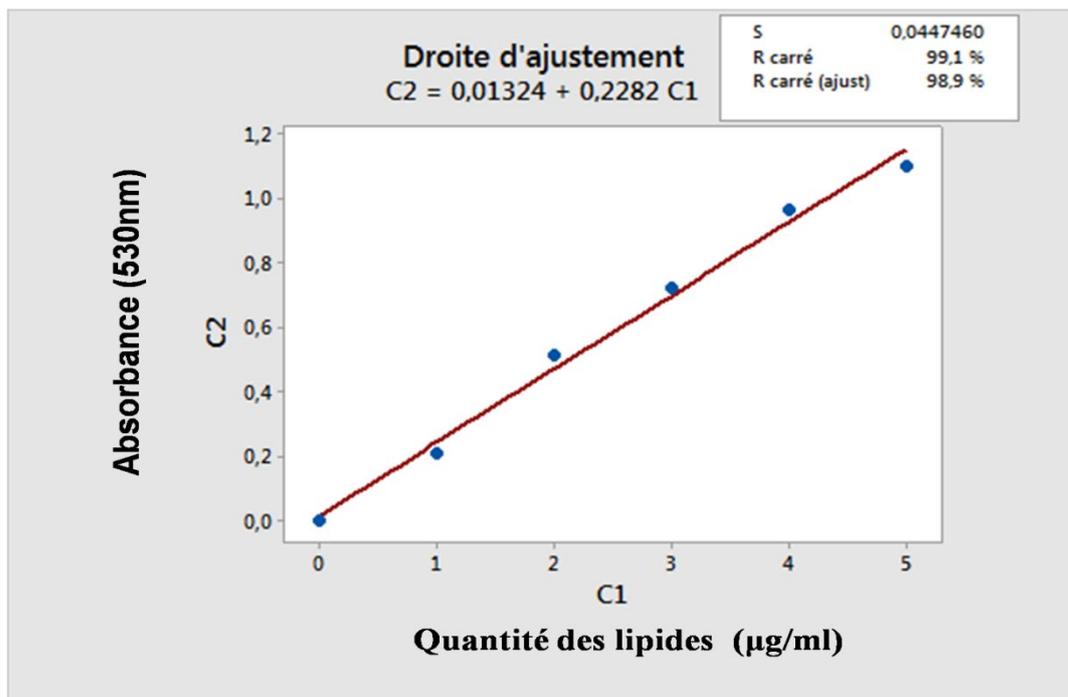


Figure: courbe d'étalonnage des lipides.

2.3. Courbe d'étalonnage pour dosage de glucide.

Annex

Tableau: Réalisation de la courbe d'étalonnage pour dosage des glucides.

Tubes	0	1	2	3	4	5
Solution mère (glucose) (µl)	0	20	40	60	80	100
Eau distillé (µl)	100	80	60	40	20	0
Réactif d'anthrone (ml)	4	4	4	4	4	4

Tableau: réalisation de la gamme d'étalonnage pour les glucides.

Tubes	0	1	2	3	4	5
DO	0	0,206	0,310	0,512	0,734	0,955

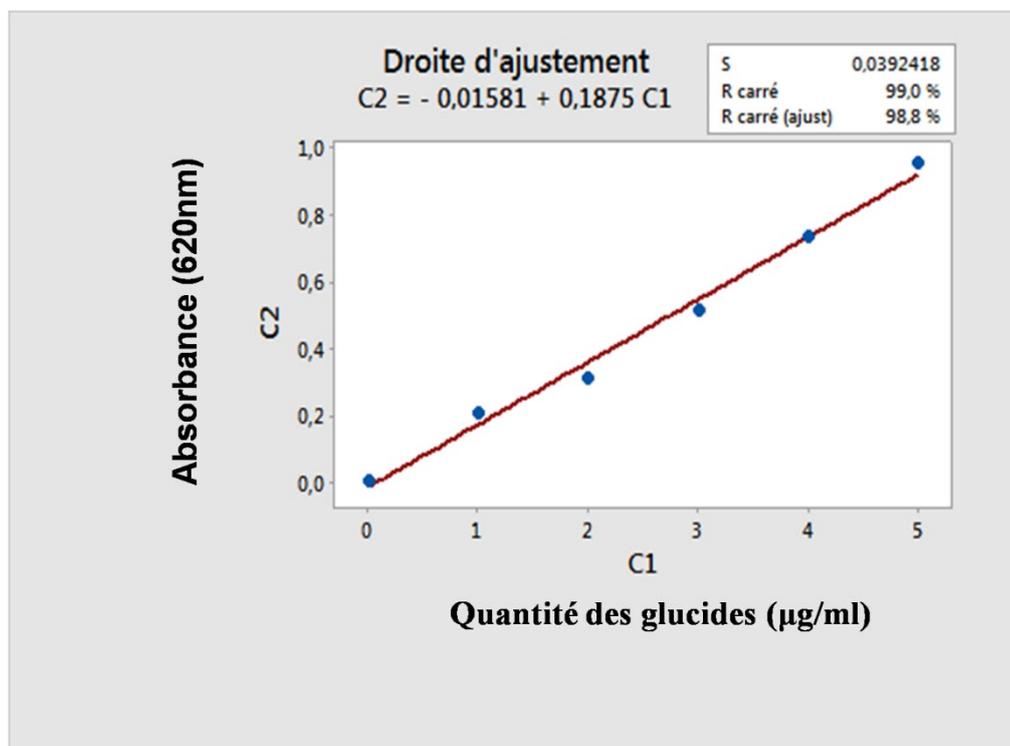


Figure: courbe d'étalonnage des glucides.