

4.4. L'élimination .....	23
5. L'arsenic et Le stress oxydatif .....	25
5.1. Induction de protéines de stress .....	26
5.2. Effets sur l'ADN .....	26

## CHAPITRE III. LE SÉLÉNIUM

1. Propriétés physicochimiques .....	27
2. Sources et les formes principales du sélénium.....	27
3. Utilisation industrielle du sélénium .....	29
4. Métabolisme du sélénium .....	29
5. Importance biologique du sélénium .....	30
5.1. Le rôle antioxydant des sélénoprotéines et enzymes sélénodépendantes .....	30
5.2. Autres rôles biologiques .....	31
5.3. Interaction avec les minéraux .....	32
6. Apport supplémentaire et toxicité .....	33

## CHAPITRE IV. *PISTACIA LENTISCUS*

1. Description botanique de <i>Pistacia lentiscus</i> .....	34
2. Classification taxonomique de <i>Pistacia lentiscus</i> .....	36
3. Composition en métabolite secondaire et les effets biologiques et thérapeutiques de <i>Pistacia lentiscus</i> .....	36
3.1. Les feuilles .....	36
3.2. Le Mastic (Résine) .....	37
3.3. Les fruits .....	37
3.4. Les huiles essentielles.....	38
3.5. L'huile fixe (huile de lentisque) .....	38

## PARTIE PRATIQUE

### CHAPITRE I. MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Les produits chimiques.....	40
2. Matériel végétal .....	40
2.1. Mode d'obtention de l'huile.....	40
2.2. Mesures des paramètres physico-chimiques de l'huile de <i>Pistacia lentiscus</i> .....	40
3. Matériel biologique et conditions d'élevage .....	41
4. Traitement des rats .....	42
4.1. Expérimentation 1 .....	42
4.2. Expérimentation 2 .....	42
5. Sacrifices et prélèvements des organes .....	43
5.1. Prélèvement sanguin .....	43
5.2. Prélèvement des organes .....	43
6. Méthodes de dosage des paramètres biochimiques .....	46
6.1. Dosage des protéines totales .....	46

6.2. Dosage d'albumine .....	46
6.3. Dosage d'Aspartate aminotransférase .....	47
6.4. Dosage d'Alanine aminotransférase .....	47
6.5. Dosage de la phosphatase alcaline .....	48
6.6. Dosage de la bilirubine totale.....	48
6.7. Dosage de la créatinine .....	49
6.8. Dosage de l'urée.....	49
6.9. Dosage du glucose .....	50
6.10. Dosage de cholestérol total.....	51
6.11. Dosage des triglycérides .....	51
7. Dosage des paramètres du stress oxydant .....	52
7.1. Préparation de l'homogénat .....	52
7.2. Dosage des protéines .....	53
7.3. Dosage de malondialdéhyde (MDA) .....	54
7.4. Dosage du glutathion (GSH) .....	55
7.5. Dosage des Métallothionéines (MTs) .....	56
7.6. Dosage de l'activité enzymatique de la glutathion peroxydase (GPx) .....	58
7.7. Dosage de l'activité enzymatique de la Glutathion S-Transférase (GST) .....	59
7.8. Dosage de l'activité enzymatique de la Catalase (CAT) .....	60
7.9. Dosage de l'activité enzymatique de la de la Superoxyde dismutase (SOD) .....	60
8. l'étude histologique .....	61
9. Traitement statistique des résultats.....	63

## CHAPITRE II. RÉSULTATS DE LA PREMIÈRE EXPÉRIMENTATION

1. Etude pondérale .....	64
1.1. Action sur la croissance corporelle .....	64
1.2. Action sur le poids relatif de certains organes .....	64
2. L'étude de quelques paramètres hématologiques .....	67
3. L'étude des paramètres biochimiques .....	70
3.1. Bilan hépatique .....	70
3.2. Bilan rénal .....	71
3.3. Bilan énergétique .....	71
4. .L'étude de quelques paramètres du stress oxydant .....	75
4.2. Malondialdéhyde (MDA) .....	76
4.1. Glutathion réduit (GSH).....	76
4.3. Glutathion peroxydase (GPx) .....	78
4.4. Glutathion -S- transférase (GST).....	78
5. Etude histologique du foie .....	81

## CHAPITRE III. RÉSULTATS DE LA DEUXIÈME EXPÉRIMENTATION

1. Mesures des paramètres physico-chimiques .....	83
2. Etude pondérale .....	83
2.1. Action sur la croissance corporelle .....	83
2.2. Action sur le poids relatif de certains organes .....	83
3. L'étude de quelques paramètres hématologiques .....	86
4. L'étude des paramètres biochimiques .....	89
4.1. Bilan hépatique .....	89
4.2. Bilan rénal .....	90
4.3. Bilan énergétique et lipidique .....	90
5. L'étude de quelques paramètres du stress oxydant .....	94
5.1. Les paramètres non enzymatiques .....	94
5.1.1. Malondialdéhyde (MDA) .....	94
5.1.2. Glutathion réduit (GSH) .....	94
5.1.3. Les métallothionines (MTs) .....	95
5.2. Les enzymatiques antioxydantes .....	99
5.2.1. Glutathion peroxydase (GPx) .....	99
5.2.2. Glutathion -S- transférase (GST) .....	99
5.2.3. La catalase (CAT) .....	102
5.2.4. La superoxyde dismutase (SOD) .....	102
6. L'étude histologique .....	105

## CHAPITRE IV. LA DISCUSSION

1. Evaluation des effets cytotoxiques de l'arsenic chez les rats <i>Wistar</i> : Effets sur certains facteurs de croissance et sur la variation des paramètres hématologiques, biochimiques, histopathologie et du profil du stress oxydant .....	108
2. L'étude de l'effet cytoprotecteur et la capacité anti-oxydante du sélénium contre les effets nocifs de l'arsenic chez les rats .....	116
3. Etude de la capacité préventive et cytoprotectrice de l'huile de <i>Pistacia lentiscus</i> sur la cytotoxicité de l'arsenic chez les rats .....	119

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES .....	123
-----------------------------------	-----

BIBLIOGRAPHIE .....	126
---------------------	-----

ANNEXES .....	156
---------------	-----

## LISTE DES COMMUNICATIONS

### Publications

**Klibet F.**, Boumendjel A., Khiari M., ElFeki A., Messarah M. (2015). Oxidative stress-related liver dysfunction by sodium arsenite: Alleviation by *Pistacia lentiscus* oil. *Pharmaceutical biology*.

Messarah M., **Klibet F.**, Boumendjel A., Abdenmour C., Bouzerna N., Boulakoud M.S., ElFeki A. (2012). Hepatoprotective role and antioxidant capacity of selenium on arsenic-induced liver injury in rats. *Experimental and Toxicologic Pathology* 64. 167– 174

### Communication orale

**Klibet F.**, Messarah M., Boumendjel A., Boulakoud M.S., Bouzerna N. Hépatotoxicité et les perturbations biochimiques induites par l'arsenic chez les rats de la souche Wistar : Effet protecteur du sélénium. 3èmes Journées Scientifiques de l'ATT « Toxicologie-Environnement-Santé » Tabarka 03-05 Février 2012.

### Posters

**Klibet F.**, Messarah M., Boumendjel A., Boulakoud M.S., Bouzerna N. Impact du sélénium sur quelques paramètres biochimiques et hépatiques du stress oxydant induit par l'arsenic chez le rat de la souche Wistar. Les Journées Internationales de Biotechnologie de l'Association Tunisienne de Biotechnologie 19-22 Décembre 2010, Yasmine Hammamet. Tunisie.

**Klibet F.**, Messarah M., Boumendjel A., Boulakoud M. ., Bouzerna N. L'effet du sélénium sur le stress oxydatif induit par l'arsenic chez le rat wistar : Aspects Biochimique et Histologique. 23<sup>ème</sup> Forum international des Sciences Biologiques et de Biotechnologie 21 - 24 mars 2012 Yasmine Hammamet. Tunisie.

**Klibet F.**, Messarah M., Boumendjel A., LADJAMA A., Bouzerna N. Hépatotoxicité et les perturbations biochimiques induites par l'arsenic chez les rats de la souche Wistar L'effet protecteur du sélénium. 23<sup>ème</sup> Forum international des Sciences Biologiques et de Biotechnologie. Association pour la Recherche En Toxicologie 20 et 21 juin 2013. Paris. France.

**Klibet F.**, Boumendjel A., Khiari M ; Messarah M. Hépatotoxicité et les perturbations biochimiques induites par l'arsenic chez les rats de la souche Wistar L'effet préventif et antioxydant du *Pistacia lentiscus*. 1<sup>er</sup> Congrès international Biotoxicologie et Bioactivité. 26 et 27 Novembre 2014. Oran. Algérie.

**Klibet F.**, Boumendjel A., Khiari M ; Messarah M. L'effet antioxydant et protecteur de l'huile de *Pistacia lentiscus* contre le dysfonctionnement hépatique et le stress oxydatif induites par l'arsenic chez les rats de la souche Wistar. The First international congress of Nutrition and Food Science. 20-22 Novembre 2015. Tlemcen. Algérie.



## ***ABREVIATIONS***

<b>As</b>	: Arsenic.
<b>Asi</b>	: Arsenic inorganique.
<b>As III</b>	: Arsenic inorganique trivalent (arsénite).
<b>As V</b>	: Arsenic inorganique pentavalent (arséniate)
<b>ALAD</b>	: $\delta$ -Aminolévulinique déhydratase.
<b>BSA</b>	: Sérum albumine bovine
<b>BHT</b>	: Butylhydroxy toléine
<b>CAT</b>	: Catalase.
<b>CCMH</b>	: Concentration corpusculaire moyen en hémoglobine.
<b>CDNB</b>	: 1-chloro, 2,4-dinitrobenzène
<b>Cu</b>	: Cuivre.
<b>Cu/Zn-SOD</b>	: Superoxyde dismutase aux ions cuivre et zinc.
<b>DNTB</b>	: Acide 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoïque) ou réactif d'Ellman.
<b>EDTA</b>	: Ethylène diamine tétra-acétique.
<b>EOA</b>	: Espèces Oxygénées Activées.
<b>ERO</b>	: Espèces Réactives de l'Oxygène.
<b>G6PDH</b>	: Glucose-6-phosphate déshydrogénase.
<b>GB</b>	: Globules Blancs.
<b>GPX</b>	: Glutathion peroxydase.
<b>GR</b>	: Glutathion réductase.
<b>GR</b>	: Globules Rouges.
<b>GSH</b>	: Glutathion réduit.
<b>GSSG</b>	: Glutathion oxydé.
<b>GST</b>	: Glutathion S-transférase.
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	: Peroxyde d'hydrogène.
<b>Hb</b>	: Hémoglobine.
<b>HPL</b>	: Huile de <i>Pistacia lentiscus</i> .
<b>4-HNE</b>	: 4-hydroxy-2-nonéanal.
<b>Hsp</b>	: Heat-shock protein (protéine de choc thermique).
<b>LOOH</b>	: Hydroxyde lipidique.
<b>LPO</b>	: Peroxydes lipidiques.
<b>MDA</b>	: Malondialdéhyde.
<b>Mn-SOD</b>	: Superoxyde dismutase associée au manganèse.
<b>MTs</b>	: Métallothionéines.
<b>NADPH</b>	: Nicotinamide dinucleotide phosphate.
<b>NBT</b>	: Nitro-bleu tetrazolium.
<b>•OH</b>	: Radical hydroxyle.
<b><sup>1</sup>O<sub>2</sub></b>	: Oxygène singulet.
<b>O<sub>2</sub>•-</b>	: Radical superoxyde (anion superoxyde).
<b>PL</b>	: <i>Pistacia lentiscus</i> .

<b>PLo</b>	: <i>Pistacia lentiscus</i> oil (huile de <i>Pistacia lentiscus</i> )
<b>ROS</b>	: Reactive oxygen species ou Espèces activées de l'oxygène.
<b>Se</b>	: Sélénium.
<b>SeCyst</b>	: Sélénocystéine.
<b>SeMet</b>	: Sélénométhionine.
<b>SOD</b>	: Superoxyde dismutase.
<b>TBA</b>	: "2-Thiobarbituric acid": L'acide thiobarbiturique
<b>TCA</b>	: Trichloroacétique.
<b>TGMH</b>	: Teneur globulaire moyenne en hémoglobine.
<b>TrxR</b>	: Thiorédoxine réductase.
<b>VGM</b>	: Volume globulaire moyen des hématies.
<b>Zn</b>	: Zinc.

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 1.</b> Les principales espèces réactives .....	<b>01</b>
<b>Tableau 2.</b> Propriétés physico-chimiques de l'arsenic .....	<b>17</b>
<b>Tableau 3.</b> Principales utilisations des composés arséniés .....	<b>18</b>
<b>Tableau 4.</b> Les principales formes chimiques du sélénium .....	<b>27</b>
<b>Tableau 5.</b> Type et normes des différentes déterminations physico-chimiques .....	<b>41</b>
<b>Tableau 6.</b> Composition de l'alimentation pour 1 kilogramme d'aliment.....	<b>41</b>
<b>Tableau 7.</b> Variation de poids corporel PC (g) et de poids relatif PR (g/100 g de poids corporel) des organes (foie, reins et testicules) chez les rats témoins et traités par le sélénite de sodium, l'arsénite de sodium et à la combinaison (l'arsénite de sodium/sélénite de sodium) .....	<b>65</b>
<b>Tableau 8.</b> Variation de quelques paramètres hématologiques chez les rats témoins et les traités ; par le sélénite de sodium, l'arsénite de sodium et à la combinaison (l'arsénite de sodium/sélénite de sodium) après 21 jours de traitement .....	<b>68</b>
<b>Tableau 9.</b> Variation de quelques paramètres biochimiques chez les rats témoins et les traités ; par le sélénite de sodium, l'arsénite de sodium et à la combinaison (l'arsénite de sodium/sélénite de sodium) après 21 jours de traitement .....	<b>72</b>
<b>Tableau 10.</b> Variation de glutathion (nmol/mg prot) et de MDA (nmol/mg prot) dans les organes (Foie, rein et testicule) chez les rats témoins et traités ; par le sélénite de sodium, l'arsénite de sodium et à la combinaison (l'arsénite de sodium/sélénite de sodium) après 21 jours de traitement .....	<b>75</b>
<b>Tableau 11.</b> Activité enzymatique de la GPx (mol GSH/mg prot) et de la GST (nmol GST/min/mg prot) dans les organes (Foie, reins et testicules) chez les rats témoins et traités par le sélénite de sodium, l'arsénite de sodium et à la combinaison (l'arsénite de sodium/sélénite de sodium) après 21 jours de traitement .....	<b>79</b>
<b>Tableau 12.</b> Les propriétés physico-chimiques de l'huile de lentisque .....	<b>83</b>
<b>Tableau 13.</b> Variation de poids corporel PC (g) et de poids relatif PR (g/100g de poids corporel) des organes (foie, reins, cœur et testicules) chez les rats témoins et les rats traités et par PLo, l'arsénite de sodium et à la combinaison (PLo/l'arsénite de sodium).....	<b>84</b>
<b>Tableau 14.</b> Variation de quelques paramètres hématologiques chez les rats témoins et les traités; par PLo, l'arsénite de sodium et par la combinaison (PLo/l'arsénite de sodium).....	<b>87</b>

<b>Tableau 15.</b> Variation de quelques paramètres biochimiques chez les rats témoins et les rats traités; par PLo, l'arsénite de sodium et par la combinaison (PLo /l'arsénite de sodium).....	<b>91</b>
<b>Tableau 16.</b> Variation de MDA (nmol/mg prot), GSH (nmol/mg prot) et MTs (µg/g prot) dans les organes (Foie, reins, cœur et testicules) chez les rats témoins et les rats traités; par PLo, l'arsénite de sodium et par la combinaison (PLo /l'arsénite de sodium).....	<b>96</b>
<b>Tableau 17.</b> Activité enzymatique de la GPx (mol GSH/mg prot) et de la GST (nmol GST/min/mg prot) dans les organes (Foie, reins, cœur et testicules) chez les rats témoins et les rats traités; par PLo, l'arsénite de sodium et par la combinaison (PLo /l'arsénite de sodium) .....	<b>100</b>
<b>Tableau 18.</b> Activité enzymatique de CAT (µmol H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /min/mg prot) et de la SOD (U/mg protein) Dans les organes (Foie, reins, cœur et testicules) chez les rats témoins et les rats traités; par PLo, l'arsénite de sodium et par la combinaison (PLo /l'arsénite de sodium) .....	<b>103</b>

# LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1.</b> L'origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqués en biologie.....	4
<b>Figure 2.</b> Réactions catalysées par la GPx et la glutathion réductase et source d'équivalents réducteurs .....	6
<b>Figure 3.</b> Mode de distribution des résidus de cystéines au sein d'une métallothionéine de mammifères .....	9
<b>Figure 4.</b> Structure de base des flavonoïdes.....	10
<b>Figure 5.</b> Mécanisme en chaîne de la peroxydation des acides gras polyinsaturés et nature des produits terminaux formés .....	14
<b>Figure 6.</b> Les différentes cibles des Espèces Réactives de l'Oxygène .....	14
<b>Figure 7.</b> Principales espèces arsénisées détectées dans l'environnement.....	21
<b>Figure 8.</b> Fixation de As [III] aux groupements SH des protéines et intervention de As [V] dans la glycolyse.....	21
<b>Figure 09.</b> Le métabolisme de l'arsenic.....	24
<b>Figure 10.</b> Schéma simplifié du métabolisme cellulaire du sélénium .....	30
<b>Figure 11.</b> Description botanique de <i>Pistacia lentiscus</i> .....	35
<b>Figure 12.</b> Composition en métabolite secondaire de différentes parties de <i>Pistacia lentiscus</i> .....	39
<b>Figure 13.</b> Schéma récapitulatif de la première expérience.....	44
<b>Figure 14.</b> Schéma récapitulatif de la deuxième expérience .....	45
<b>Figure 15.</b> La gamme d'étalonnage utilisée (BSA 1mg/ml) pour le dosage des protéines .....	53
<b>Figure 16.</b> Réaction du dialdéhyde malonique avec l'acide thiobarbiturique .....	54
<b>Figure 17.</b> Courbe standard de GSH exprimé µg en pour le dosage des métallothionéine .....	57
<b>Figure 18.</b> Variation de poids corporel en (g) des rats témoins et traités et traités par le sélénite de sodium, l'arsénite de sodium et à la combinaison (l'arsénite de sodium/sélénite de sodium) après 21 jours de traitement .....	66
<b>Figure 19.</b> Evolution du poids relatif des reins (g/100g Pc) chez les rats témoins et traités par le sélénite de sodium, l'arsénite de sodium et à la combinaison (l'arsénite de sodium/sélénite de sodium) après 21 jours de traitement .....	66

- Figure 20.** Variation des globules rouges ( $\times 10^6/\mu\text{l}$ ), Taux d'hémoglobine (g/dl), Taux d'hématocrite (%), VGM (fl), des globules blancs ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ ), Les plaquettes ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ ), TGMH (g/dl) et CCMH (pg) chez les rats témoins et les traités ; par le sélénite de sodium, l'arsénite de sodium et à la combinaison (l'arsénite de sodium/sélénite de sodium) après 21 jours de traitement ..... **69**
- Figure 21.** Variation de la concentration plasmatique des protéines totales, d'albumine (g/l), la bilirubine totale (mg/l), l'activité enzymatique des transaminases et la phosphatase alcaline (UI/L) chez les rats témoins et les rats traités ; par le sélénite de sodium, l'arsénite de sodium et à la combinaison (l'arsénite de sodium/sélénite de sodium) après 21 jours de traitement..... **73**
- Figure 22.** Variation de la concentration plasmatique en créatinine et l'urée (mg/dl), chez les rats témoins et les traités ; par le sélénite de sodium, l'arsénite de sodium et à la combinaison (l'arsénite de sodium/sélénite de sodium) après 21 jours de traitement ..... **74**
- Figure 23.** Variation de la concentration plasmatique en glucose (mg/dl), chez les rats témoins et les traités ; par le sélénite de sodium, l'arsénite de sodium et à la combinaison (l'arsénite de sodium/sélénite de sodium) après 21 jours de traitement ..... **74**
- Figure 24.** Variation de la teneur cellulaire en glutathion (nmol/mg prot) dans les organes (Foie, reins et testicules) chez les rats témoins et traités ; par le sélénite de sodium, l'arsénite de sodium et à la combinaison (l'arsénite de sodium/sélénite de sodium) après 21 jours de traitement..... **77**
- Figure 25.** Variation de malondialdéhyde (nmol/mg prot) dans les organes (foie, reins et testicules) chez les rats témoins et traités par le sélénite de sodium, l'arsénite de sodium et à la combinaison (l'arsénite de sodium/sélénite de sodium) après 21 jours de traitement ..... **77**
- Figure 26.** Variation de l'activité enzymatique de la glutathion peroxydase ( $\mu\text{mol GSH/mg prot}$ ) dans les organes (foie, reins et testicules) chez les rats témoins et traités par le sélénite de sodium, l'arsénite de sodium et à la combinaison (l'arsénite de sodium/sélénite de sodium) après 21 jours de traitement ..... **80**
- Figure 27.** Variation de l'activité enzymatique de la glutathion S-transférase (nmol GST/min/mg prot) dans les organes (foie et reins) chez les rats témoins et traités par le sélénite de sodium, l'arsénite de sodium et à la combinaison (l'arsénite de sodium/sélénite de sodium) après 21 jours de traitement ..... **80**
- Figure 28.** Les coupes histologiques de foie d'un rat témoin (A) et traités par le Se (B), l'As (C) et par la combinaison Se/As (D) colorées à Hématéine-Eosine 400X..... **82**
- Figure 29.** Variation de poids corporel (Poids initial et final en g) des rats témoins et traités et les rats traités; par PLo, l'arsénite de sodium et à la combinaison (PLo/l'arsénite de sodium) ..... **85**

<b>Figure 30.</b> Les poids relatifs des organes foie, reins, cœur et testicules (g/100 g Pc) chez les rats témoins et les rats traités; par PLo, l'arsénite de sodium et par la combinaison (PLo /l'arsénite de sodium).....	<b>85</b>
<b>Figure 31.</b> Variation des globules rouges ( $\times 10^6/\mu\text{l}$ ), Taux d'hémoglobine (g/dl), Taux d'hématocrite (%), VGM (fl), des globules blancs ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ ), Les plaquettes ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ ), TGMH (g/dl) et CCMH (pg) chez les rats témoins et les rats traités; par PLo, l'arsénite de sodium et par la combinaison (PLo /l'arsénite de sodium) ....	<b>88</b>
<b>Figure 32.</b> Variation de la concentration plasmatique des protéines totales, d'albumine (g/l), la bilirubine totale (mg/l) et l'activité enzymatique des transaminases et la phosphatase alcaline (UI/L) chez les rats témoins et les traités; par PLo, l'arsénite de sodium et par la combinaison (PLo /l'arsénite de sodium).....	<b>92</b>
<b>Figure 33.</b> Variation de la concentration plasmatique en créatinine, l'urée et l'acide urique (mg/dl), chez les rats témoins et les rats traités; par PLo, l'arsénite de sodium et par la combinaison (PLo /l'arsénite de sodium).....	<b>93</b>
<b>Figure 34.</b> Variation de la concentration plasmatique en glucose, Cholestérol total et Triglycérides (mg/dl), chez les rats témoins et les rats traités; par PLo, l'arsénite de sodium et par la combinaison (PLo /l'arsénite de sodium) .....	<b>93</b>
<b>Figure 35.</b> Variation du malondialdéhyde (nmol/mg prot) dans les organes (Foie, reins, cœur et testicules) chez les rats témoins les rats traités; par PLo, l'arsénite de sodium et par la combinaison (PLo /l'arsénite de sodium).....	<b>97</b>
<b>Figure 36.</b> Variation de la teneur cellulaire en glutathion (nmol/mg prot) dans les organes (Foie, reins, cœur et testicules) chez les rats témoins et les rats traités; par PLo, l'arsénite de sodium et par la combinaison (PLo /l'arsénite de sodium) .....	<b>98</b>
<b>Figure 37.</b> Variation de la teneur cellulaire en métallothionéines ( $\mu\text{g/g}$ d'organe) dans les organes (Foie, reins et cœur) chez les rats témoins et les rats traités; par PLo, l'arsénite de sodium et par la combinaison (PLo /l'arsénite de sodium) .....	<b>98</b>
<b>Figure 38.</b> Variation de l'activité enzymatique de la glutathion peroxydase ( $\mu\text{mol GSH/mg prot}$ ) dans les organes (Foie, reins, cœur et testicules) chez les rats témoins et les rats traités; par PLo, l'arsénite de sodium et par la combinaison (PLo /l'arsénite de sodium) .....	<b>101</b>
<b>Figure 39.</b> Variation de l'activité enzymatique de la glutathion S-transférase (nmol GST/min/mg prot) dans les organes (Foie, reins, cœur et testicules) chez les rats témoins et les rats traités; par PLo, l'arsénite de sodium et par la combinaison (PLo /l'arsénite de sodium) .....	<b>101</b>
<b>Figure 40.</b> Variation de l'activité enzymatique de la catalase ( $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{min/mg prot}$ ) dans les organes (foie, reins, cœur et testicules) chez les rats témoins et les rats traités; par PLo, l'arsénite de sodium et par la combinaison (PLo /l'arsénite de sodium).....	<b>104</b>

- Figure 41.** Variation de l'activité enzymatique de la superoxyde dismutase (U/mg prot) dans les organes (Foie, reins, cœur et testicules) chez les rats témoins et les rats traités; par PLo, l'arsénite de sodium et par la combinaison (PLo /l'arsénite de sodium).....**104**
- Figure 42.** Les coupes histologiques du foie de rat témoin (A) et traités par PLo (B), l'As (C) et par la combinaison (PLo/As) colorées à Hématéine-Eosine 100 X.....**106**
- Figure 43.** Coupes histologiques des reins colorées à Hématéine-Eosine. (A) rat témoin, (B) traité par PLo, (C) traité par l'As et (D) traité par la combinaison PLo /As (H & E 100X) .....**107**





# INTRODUCTION GÉNÉRALE

### Introduction générale

Le développement industriel, agricole et urbain est accompagné inévitablement par des problèmes de pollution de l'environnement. En effet, du fait de l'activité humaine, plusieurs milliers de substances chimiques comme les pesticides et les métaux lourds arrivent à notre environnement et provoquent des problèmes sanitaires.

L'Arsenic (As) est parmi les métaux lourds les plus toxiques, il est largement distribué dans l'environnement sous deux formes organiques et inorganiques. Les principales sources d'exposition humaine à des composés arséniés sont ; les contacts professionnels ou environnementaux, de l'eau potable contaminée et la pollution industrielle. Des études ont montré que des millions de personnes dans le monde sont à risque d'intoxication chronique par l'arsenic où la toxicité de l'arsenic est devenue un problème de santé mondial. L'arsenic inorganique provoque le cancer de la peau, de la vessie, du poumon, du rein et du foie, et augmente le risque de diabète et les maladies cardio-vasculaires.

Bien que la toxicité induite par l'arsenic a été signalé à plusieurs reprises, mais le mécanisme exact derrière leur toxicité n'est pas encore clair. Le stress oxydatif est l'un des mécanismes proposés de cette toxicité.

Arsenic génère les radicaux libres tels que le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), les radicaux hydroxylés ( $HO\cdot$ ), oxyde nitrique ( $NO\cdot$ ), anions superoxydes ( $O_2^{\cdot-}$ ), peroxydiméthylarsinique ( $[(CH_3)_2AsOO\cdot]$ ) et radicaux de diméthylarsinique ( $[(CH_3)_2As\cdot]$ ). Ces espèces réactives d'oxygène peuvent être responsables de la pathogenèse et la toxicité liés à l'arsenic.

Parmi les différents mécanismes de défense mis en place suite à une contamination par un métal lourd, le système pro/antioxydant. Ce dernier est le plus souvent cité après l'exposition à l'arsenic.

Par conséquent, l'augmentation de la capacité antioxydante des cellules par la supplémentation de quelques antioxydants comme la vitamine C, la vitamine E ou certains micronutriments tels que le zinc est devenue une stratégie thérapeutique pour la lutter contre la toxicité de l'arsenic.

De plus, un très grand nombre des plantes médicinales possèdent des propriétés biologiques très intéressantes sont appliquées dans divers domaines à savoir en médecine, pharmacie, agriculture et cosmétologie. Ces plantes représentent une nouvelle source de composés actifs. En effet, elles sont l'objectif de nombreuses recherches, notamment de la recherche de nouveaux constituants naturels qui ont un pouvoir antioxydant considérable, tels les composés phénoliques, les huiles essentielles et les huiles fixes.

Dans ce contexte, le challenge de notre étude est de trouver un traitement préventif / thérapeutique contre la cytotoxicité de l'arsenic, qui pourrait être ; pas cher, facilement disponible, efficace à faible dose, moins toxique, avec un mode d'administration convenable et ayant un pouvoir antioxydant puissant qui pourrait séquestrer l'arsenic à partir des sites intracellulaires et extracellulaires.

Dans ce but, nous avons choisi deux traitements pour évaluer leurs effet protecteur sur le système pro/anti-oxydant et les effets toxiques de l'arsenic ;

- ✓ Le sélénium qui est un micronutriment d'une grande importance en nutrition humaine. Connue d'abord comme un puissant antioxydant, le sélénium exerce beaucoup d'autres fonctions biologiques, ceci grâce aux protéines auxquelles il est associé (sélénoprotéines).
- ✓ L'huile de *Pistacia lentiscus*, qui est utilisée dans la médecine traditionnelle pour le traitement des petites blessures, brûlures légères et érythèmes. Elle est employée par voie orale contre les problèmes respiratoires d'origine allergique et les ulcères de l'estomac.

Pour ce faire, nous avons réalisé deux expérimentations; dans la première, des rats blancs de la souche « Wistar » pubère et en période de croissance, ont été soumis à un traitement par l'arsénite de sodium en présence et en absence du sélénium administrés par injection intrapéritonéale et par voie orale respectivement.

Avec le même esprit, pour tester la capacité d'huile de *Pistacia lentiscus* à prévenir les dommages oxydatifs induits par l'arsenic, une deuxième expérimentation a été effectuée par un traitement à cette l'huile avant et pendant l'exposition à l'arsenic.

Une analyse sur les effets des différents traitements a été effectuée par :

- ❑ La détermination de quelques paramètres de croissance ;
- ❑ L'étude de quelques paramètres biochimiques et hématologiques;
- ❑ L'évaluation de système pro/anti-oxydant par la détermination des activités enzymatiques ; des superoxydes dismutases (SOD), de la glutathion peroxydases (GPx), la catalase (Cat) et quelques éléments non enzymatiques comme le glutathion réduit et les métallothionines ;
- ❑ L'étude histologique de deux organes cibles (Foie et rein) ;
- ❑ Une discussion de l'ensemble des résultats obtenus.

---

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

---



CHAPITRE I : LE STRESS OXYDATIF

CHAPITRE II : L'ARSENIC

CHAPITRE III : LE SÉLÉNIUM

CHAPITRE IV : *PISTACIA LENTISCUS*

---

## I. Le stress oxydant

Dans le système biologique, il existe un équilibre entre les espèces réactives de l'oxygène (EROs) qui sont présentes à l'état basal en faible concentration et le système antioxydant qui contient notamment des enzymes, des vitamines, des oligoéléments. Ce système est un moyen de défense en cas de production excessive d'EROs.

Le stress oxydant donc se définit comme un déséquilibre de la balance entre les systèmes de défenses antioxydants et la production des EROs, en faveur de ces dernières (Favier, 2003). Ce déséquilibre peut avoir, une origine endogène tels que la surproduction d'agent pro-oxydant d'origine inflammatoire, un déficit nutritionnel en antioxydants, ou une origine exogène tels les polluants photochimiques le tabac, les drogues, les radiations ionisantes ou les métaux lourds (Favier, 1997)

### 1. Les espèces réactives de l'oxygène

On utilise le terme d'espèces actives de l'oxygène (EROs) ou Reactive Oxygen Species (ROS) pour désigner un ensemble plus large de molécules. Comme indiqué dans le tableau 1 elles peuvent être de nature radicalaire ou non. Un radical libre se définit comme tout atome, groupes d'atomes, ou molécules possédant un ou plusieurs électrons non appariés (célibataires) sur l'orbitale externe. Cette caractéristique lui confère une réactivité importante vis à vis d'autres molécules plus stables, pour capter ou céder leurs électrons, créant ainsi de nouveaux radicaux en initiant des réactions en cascade (Halliwell et Gutteridge, 2000 ; Bonnefont-Rousselot et al., 2003).

**Tableau 1.** Les principales espèces réactives (Poisson, 2013)

Espèces Radicalaires	Espèces non Radicalaires
Anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ )	oxygène singulet ( $^1O_2$ )
Radical hydroxyle ( $\cdot OH$ )	Peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ )
Monoxyde d'azote ( $NO\cdot$ )	Nitroperoxyde ( $ONOOH$ )
Grande instabilité : Stabilisation par réaction avec les constituants cellulaires	Eléments de décomposition pour la détoxification par les systèmes

Les radicaux primaires dérivent de l'oxygène par des réductions à un électron, tels que l'anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ), le radical hydroxyle ( $\cdot OH$ ) et le monoxyde d'azote ( $NO\cdot$ ) (Yoshikawa et al., 2000). D'autres espèces dérivées de l'oxygène comme l'oxygène singulet ( $^1O_2$ ), le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) et le nitroperoxyde ( $ONOOH$ ) ne sont pas des radicaux libres (ne possédant pas d'électron célibataire), mais sont aussi réactives et peuvent être des précurseurs de radicaux (Favier, 2003) (Voir fig.1).

En effet le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), qui n'est pas un radical libre, mais une molécule avec tous ses électrons appariés, présente une toxicité par l'intermédiaire des réactions de type de fenton auxquelles, il peut participer sous l'influence de cations métalliques comme  $Fe^{2+}$  ou  $Cu^{2+}$  (Wardman et Candéras, 1996).

$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow \text{complexes intermédiaires} \rightarrow Fe^{3+} + \cdot OH + OH^-$  (Réaction de Fenton).

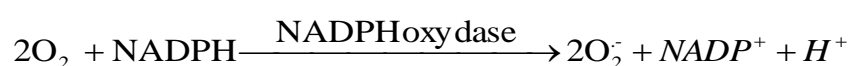
Certains radicaux formés chez les êtres vivants tels que l'anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ) et le monoxyde d'azote ( $NO\cdot$ ) ne sont pas très réactifs, ce qui explique d'ailleurs leurs utilisations par l'organisme en tant que médiateurs régulant des fonctions biologiques comme la vasodilatation capillaire et le message de neurones. Par contre, des radicaux comme les radicaux peroxydes ( $ROO\cdot$ ) ou surtout le radical hydroxyle ( $HO\cdot$ ) sont extrêmement réactifs, et ce avec la plupart des molécules des tissus vivants (Favier, 2003).

## 2. Origines et sources cellulaires des espèces réactives de l'oxygène

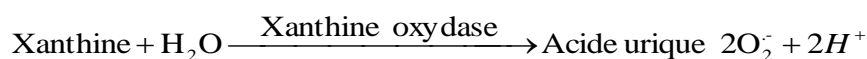
La production des EROs peut provenir d'un processus enzymatique ou non enzymatique (Thannickal, 2000). Une majorité des EROs provient de la respiration mitochondriale. En effet, au cours du transport des électrons par la chaîne respiratoire, des substances oxygénées réactives, sont générées et environ 2% de l'oxygène sont convertis en radicaux superoxyde directement réactifs au voisinage de la mitochondrie (Inoue, 2003).

Des enzymes cytoplasmiques comme l'aldéhyde déshydrogénase sont à l'origine de la formation de radicaux libres lors de leur cycle catalytique (Martinez-Cayuela, 1995). De même, la voie de synthèse des prostaglandines catalysée par deux enzymes membranaires, la lipoxigénase et la cyclo-oxygénase, implique la production de radicaux libres.

Au niveau de la membrane plasmique, la NADPH oxydase activée par le processus phagocytaire de la cellule est à l'origine aussi d'une large production de radicaux superoxyde (Vignais, 2002 ; Orient, 2007).



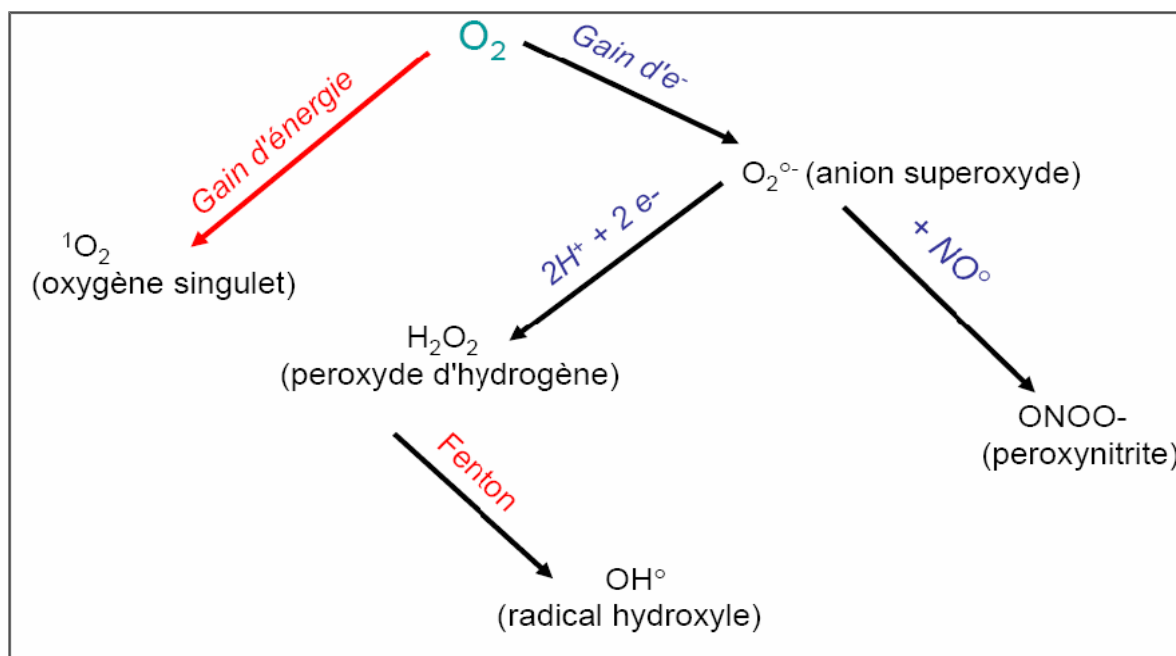
Le système enzymatique **xanthine / xanthine oxydase** est aussi considéré comme une source biologique importante d'anion superoxyde (Marfak, 2003).



Une autre source de EROs est liée à l'autoxydation de molécules comme la dopamine, adrénaline, des flavines, l'hémoglobine et les hydroquinones, le produit direct de ces autoxydations est souvent l'anion superoxyde l'O<sub>2</sub><sup>•-</sup> (Freeman et Crapo, 1981 ; Misra et al., 2009).

A certaines doses les ROS sont utiles à l'organisme, mais lorsque leur production augmente et/ ou lorsque les défenses antioxydantes ne sont plus suffisantes face à cette production, les ROS peuvent attaquer différentes cibles cellulaires (lipides, protéines et ADN) causant des dommages multiples et pouvant entraîner la mort de la cellule.





**Figure 1.** L'origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqué en biologie (Amara, 2007).

### 3. Les systèmes de défenses antioxydants

#### 3.1. Les systèmes enzymatiques

##### 3.1.1. Superoxydes dismutases (SODs)

Les superoxydes dismutases sont capables d'éliminer l'anion superoxyde ( $O_2^{\bullet -}$ ) en produisant une molécule d'oxygène et une molécule de peroxyde d'hydrogène selon la réaction suivante :

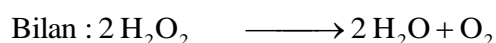
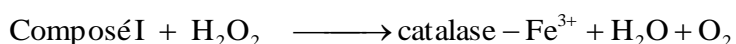
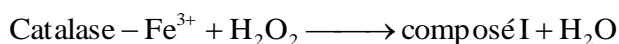


Chez les mammifères il existe 3 isoformes de SOD en fonction du métal de transition présent dans le site actif : une forme cytosolique et nucléaire associée aux ions cuivre et zinc (Cu/Zn-SOD), une forme mitochondriale associée au manganèse (Mn-SOD) et une forme extracellulaire (Cu/Zn-SOD). La forme mitochondriale permet la dismutation quasi instantanée de l'anion superoxyde ( $O_2^{\bullet -}$ ) produit au niveau de la mitochondrie (Mates et al., 1999; Zelko et al., 2002).

### 3.1.2. Catalases

Les catalases sont présentes dans un grand nombre de tissus mais sont particulièrement abondantes dans les globules rouges et les peroxysomes hépatiques. Les catalases catabolisent les peroxydes d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire (Mates et al., 1999).

La réaction se fait en deux étapes :

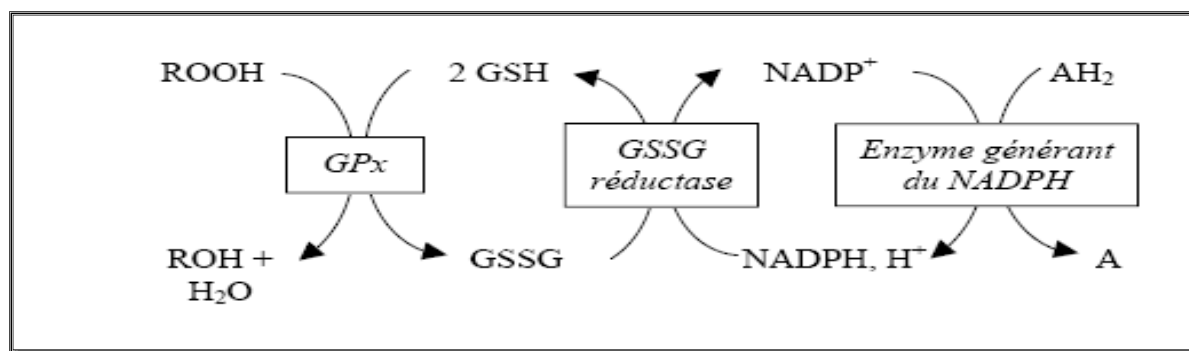


La catalase est composée de 4 sous unités protéiques, chacune contenant un groupement hémique avec  $\text{Fe}^{3+}$  lié au site actif. Chaque molécule a habituellement une molécule de NADPH,  $\text{H}^+$  qui lui liée, la protégeant ainsi d'une éventuelle inactivation par le peroxyde d'hydrogène (Bonfont-Rousselot et al., 2003).

### 3.1.3. Glutathion peroxydases

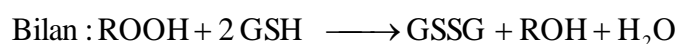
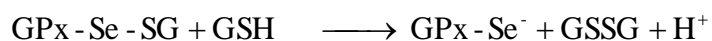
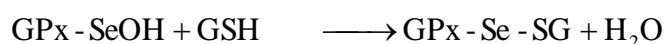
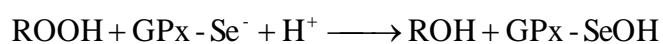
Les glutathion peroxydases constituent sans doute l'un des plus importants systèmes enzymatiques de protection, car elles sont capables non seulement de détoxifier le peroxyde d'hydrogène, mais aussi les hydroperoxydes résultants de l'oxydation du cholestérol ou des acides gras en couplant la réduction de l'hydroperoxyde avec l'oxydation d'un substrat réducteur comme le glutathion.

Le glutathion oxydé sera régénéré grâce à l'intervention de la glutathion réductase qui agit par oxydation du NADPH,  $\text{H}^+$ , formé principalement par la voie des pentoses phosphates (voir fig.2) ( Bonfont-Rousselot et al., 2003; Thérond et Denis, 2005).



**Figure 2.** Réactions catalysées par la GPx et la glutathion réductase et source d'équivalents réducteurs.

Toutes les glutathion peroxydases contiennent dans leurs sous unités un à quatre atomes de sélénium. Selon l'isoforme des glutathion peroxydase à sélénium sont retrouvées dans le plasma, dans le cytosol et au niveau de la membrane cellulaire. Elles fonctionnent toutes selon le mécanisme catalytique suivant :



La première étape consiste en une oxydation du groupement séléniol de l'enzyme par un hydroperoxyde (ROOH), suivi de la liaison successive de deux molécules de glutathion avec régénération de l'enzyme sous sa forme réduite.

L'activité anti-oxydante de ces peroxydes est cependant très dépendante de l'apport nutritionnel en sélénium.

On mesure ainsi l'importance du sélénium pour le bon fonctionnement de cette enzyme. Un déficit en sélénium conduit d'ailleurs à une baisse de l'activité enzymatique, donc à une moindre épuration des hydroperoxydes (Favier, 2003 ; Thérond et Denis, 2005).

### 3.1.4. Glutathion S-Transférases

Les glutathion S-transférases (GSTs) représentent une famille d'enzymes qui jouent un rôle important dans la détoxification de composés électrophiles. La fonction des GSTs la plus connue est leur activité de catalyser des réactions de conjugaison entre, le glutathion et des substances nocives pour diminuer leurs réactivités avec les macromolécules intracellulaires.

Les GSTs complètent l'action des glutathion peroxydases dans la seconde ligne de défense enzymatique antioxydante, les GSTs préviennent les dommages cytotoxiques et génétoxiques causés par les composés électrophiles générés comme produits de dégradation des macromolécules suite à leur exposition au stress oxydant (Hayes et Pulford, 1995).

D'autres recherches (Zakharyan et Aposhian, 1999; Aposhian et Aposhian, 2006) ont montré que la détoxification de l'arsenic chez l'être humain en particulier constitue l'étape de réduction des formes pentavalents (arséniates) en acide monométhyl-arsomique MMAV et l'acide diméthyl-arsonique DMA V dépend de l'enzyme GST de classe oméga.

D'autres enzymes comme la glutathion réductase, la thiorédoxine peroxydase et l'hème oxydase présentent également une activité anti-oxydante relativement importante.

## 3.2. Systèmes non enzymatiques

### 3.2.1. Glutathion

Le glutathion ou  $\gamma$ -glutamyl-cystéinyl-glycine, le plus abondant thiol libre non protéique dans les cellules, existe en équilibre entre deux formes, l'une réduite (GSH), et autre oxydée (GSSG). Le glutathion constitue un acteur essentiel de la défense antioxydante dans la lutte contre le stress oxydant.

La liaison  $\gamma$ -glutamyl ainsi que la fonction thiol du GSH lui confèrent un grand nombre de fonctions : le transport des acides aminés, la synthèse des œstrogènes, des prostaglandines, et des leucotriènes, la détoxification des métaux lourds et autres xénobiotiques par action directe ou indirecte. La forme réduite (GSH) rentre dans la

détoxification en réagissant avec le ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), ( $\text{ROOH}$ ), et ( $\cdot\text{OH}$ ) grâce à son pouvoir réducteur (Griffith et Mulcahy, 1999).

Le rapport GSH/GSSG est hautement régulé par le système glutathion réductase. Cependant si le niveau de stress excède la capacité de la cellule de réduire le GSSG, le GSSG peut s'accumuler (Griffith et Mulcahy, 1999). Par conséquent le rapport (GSH/GSSG) est un indicateur dynamique du stress oxydant (Dans les cellules non stressées, 99% du glutathion est présent sous sa forme réduite GSH) (Ji et al., 1992 ; Almutairi et al., 2007).

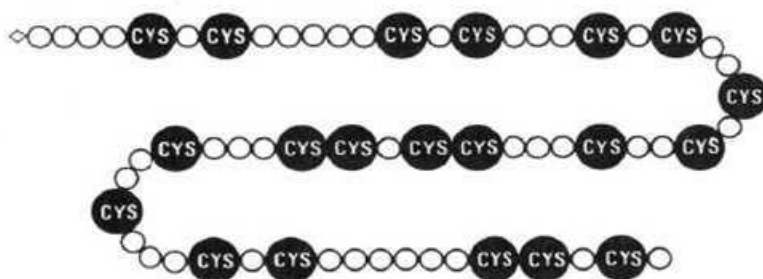
### 3.2.2. Les métallothionéines (MTs)

Les MTs sont des protéines potentiellement présentes dans tous les organismes vivants, elles passionnent beaucoup de chercheurs en raison de leur structure chimique très particulière. En effet, les MTs sont des protéines de faible poids moléculaire ( $< 7000$  Da) qui ne contiennent pas d'acides aminés aromatiques ni d'histidine, ni méthionine mais elles ont, en revanche une exceptionnelle richesse en résidus de cystéine 20 à 30% de la totalité des acides aminés (voir fig. 3) (Kagi et Vallee, 1960). Ces caractéristiques confèrent deux propriétés potentiellement utiles dans presque tous les processus biochimiques : la possibilité de lier des métaux et des propriétés rédox. Alors ils peuvent séquestrer des métaux comme l'arsenic, le cuivre, le mercure, le zinc (Achard-Joris, 2005) et le cadmium (Bebianno et Serafim, 1998 ; Geret et al., 2002). Lorsqu'elles fixent un métal physiologique elles sont activées et exercent une fonction mais lorsqu'elles fixent un métal toxique, elles sont alors inactivées et éliminées (Palmiter, 1998 ; Bioslève, 2010).

Cependant l'expression et la synthèse de MTs peut être induite par divers agents cytotoxiques (éthanol, tétrachlorure de carbone et l'arsenic), par des cytokines ou dans des conditions de stress (diète, infection, irradiation) (Andrews, 2000 ; Isani et al., 2000 ; Haq et al., 2003).

Plusieurs études ont montré que les MTs neutralisaient les radicaux libres comme  $\text{l}\cdot\text{OH}$  ou  $\text{l}\cdot\text{O}_2^{\cdot-}$  (Thornalley et Vasak, 1985 ; Kumari et al., 1998).

Les MTs sont l'un des antioxydants les plus importants du noyau, ce dernier étant dépourvu d'enzymes antioxydantes de type catalase et SOD. La fonction de piègeur les EROs par les MTs ne se limite pas au radical hydroxyle, certains dommages de l'ADN induits par d'autres types d'ERO (peroxyde d'hydrogène, radical superoxyde) sont aussi inhibés par les MTs (Rossman et al., 1992).



**Figure 3.** Mode de distribution des résidus de cystéines au sein d'une métallothionéine de mammifères (Kagi et Kojima, 1987)

### 3.2.3. Vitamine E (tocophérols)

La vitamine E regroupe la famille des tocophérols (alpha, bêta, gamma, delta) avec une activité anti-oxydante variable. L'alpha tocophérol est la forme la plus active de la classe des tocophérols. Le caractère hydrophobe de la vitamine E lui permet de s'insérer au sein des acides gras de la membrane cellulaire et des lipoprotéines. Où elle joue un rôle protecteur en empêchant la propagation de la peroxydation lipidique induite par le stress oxydant (elle capte le radical lipidique peroxyde  $\text{LOO}\cdot$ ) (Khalil, 2002 ; Vertuani, 2004).

### 3.2.4. Vitamine C (Acide ascorbique)

La vitamine C (acide ascorbique) est l'un des principaux antioxydants hydrosolubles, présent dans les fluides intra et extracellulaires. Ces activités biologiques viennent de son puissant potentiel réducteur, agit principalement en piégeant directement et très efficacement les radicaux superoxydes et hydroxyles, elle peut aussi recycler la vitamine E pour l'aider à prévenir l'oxydation des lipides (Packer et al., 1997; Evans, 2000).

### 3.2.5. Les polyphénols

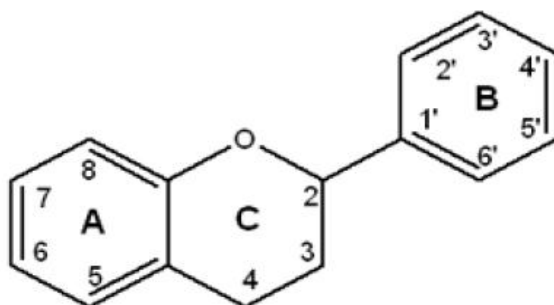
L'activité antioxydante des polyphénols est généralement attribuée à leur structure hautement conjuguée à laquelle s'ajoutent les groupements hydroxyles ce qui induit la présence d'atomes d'hydrogène labiles (Tsao, 2010). Plusieurs études suggèrent l'importance du cycle catéchol du cycle B dans le piégeage des ROS, étant donné le fort caractère électro-donneur de cette fonction (Pietta, 2000).

Ils sont généralement de bons capteurs de radicaux hydroxyles  $\cdot\text{OH}$  et peroxydes  $\text{RO}_2$ . Donc Ils sont susceptibles d'inhiber les chaînes de peroxydation lipidique (Wu et al., 2009 ; Yoshihara et al., 2010).

De plus, les polyphénols et particulièrement les flavonoïdes sont capables de chélater les métaux, grâce aux hydroxyles adjacents du cycle B ou entre ceux des cycles A et C (Pietta, 2000) (voir fig. 4).

Les flavonoïdes sont des composés ubiquistes très répandus dans les végétaux (Tanguy, 2009) Ils attirent l'attention depuis quelques années à cause de leurs propriétés antioxydantes. En effet, ils sont capables de piéger des radicaux libres, d'inhiber la peroxydation lipidique en réduisant les radicaux hydroxyl, superoxyde et peroxy. Ils sont aussi capables de piéger les ions métalliques, car ils ont des propriétés chélatrices (Pastre, 2005).

La bioactivité des flavonoïdes, et notamment de la quercétine qui a été très étudiée ne s'arrête pas uniquement aux réactions piégeuses de radicaux, mais aussi aux actions anti-cancérigènes, anti-inflammatoires, anti-agrégants ou encore vasodilatateur (Erlund, 200 ; Vicentini et al., 2011).



**Figure 4.** Structure de base des flavonoïdes

### 3.3. Oligoéléments

Le cuivre (Cu), le zinc (Zn), le manganèse (Mn), le sélénium (Se) et le fer (Fe) sont des éléments essentiels dans la défense contre le stress oxydant. Toutes les enzymes antioxydantes requièrent un cofacteur pour maintenir leur activité catalytique. Ainsi, la SOD mitochondriale a besoin de manganèse, la SOD cytosolique de cuivre et de zinc, la catalase de fer et la GPx de sélénium.

## 4. Dégâts et les biomarqueurs du stress oxydant

### 4.1. Peroxydation lipidique

Les acides gras polyinsaturés ainsi que les phospholipides membranaires sont les cibles privilégiées des attaques oxydatives. Leurs sensibilités à l'oxydation sont corrélées à leur degré d'insaturation (Pamplona et al., 2000).

La peroxydation lipidique débute par une phase *d'initiation* qui implique l'attaque des espèces réactives surtout le radical hydroxyle ( $\cdot\text{OH}$ ), entraînant l'arrachement d'un hydrogène du l'acide gras (LH), ceci aboutit à la formation d'un radical diène conjugué, qui après addition avec l'oxygène moléculaire donne le radical peroxyde ( $\text{LOO}\cdot$ ). Ensuite, ce radical peut réagir avec un autre acide gras polyinsaturé et former un hydroperoxyde ( $\text{LOOH}$ ), c'est la phase « *Propagation* » de la peroxydation lipidique.

Ces hydroperoxydes appartiennent à la famille des peroxydes lipidiques qui peuvent soit être réduits et neutralisés « phase de *Terminaison* » par la glutathion peroxydase et la vitamine E intercalée dans la bicouche lipidiques des membranes (Esterbauer et al., 1992 ; Beaudeux et al., 2003 ; Favier, 2003) (voir fig.5). Ou, continuer à s'oxyder et à se fragmenter en produits secondaires c'est-à-dire en aldéhydes très réactifs, pouvant être considérés comme des messagers secondaires toxiques qui augmentent les dommages initiaux dus aux radicaux libres.

Parmi ces aldéhydes formés lors de la peroxydation lipidique, l'isoprostane, le malondialdéhyde (MDA), et le 4-hydroxynonénal (4-HNE), qui sont très étudiés comme marqueurs de la peroxydation lipidique, ces deux derniers produits (MDA, 4-HNE) réagissent avec les protéines et l'ADN, une fois fixé à la molécule d'ADN, le



MDA semble être le produit le plus mutagène, alors que le 4-HNE est le plus toxique pour la cellule (Marnett, 1999).

#### 4.2. Oxydation des protéines

Tout comme les lipides, les protéines peuvent également être la cible des réactions radicalaires ou oxydatives et subir des modifications, ces modifications provoquent l'introduction d'un groupe carbonyle dans les protéines. Ces groupements carbonyles peuvent être générés soit par oxydation directe des acides aminés, soit par conjugaison avec des produits de peroxydation lipidique ou encore par glycation. Ces modifications conformationnelles induisent des pertes de fonctions et stimulent l'activité protéolytique du protéasome (Levine, 2002). Nous pouvons classer les réactions d'oxydations des protéines en deux catégories :

D'une part, celles qui cassent les liaisons peptidiques et modifient la chaîne protéique. Et d'autre part, les modifications des peptides par l'addition des produits issus de la peroxydation lipidiques comme le 4-HNE. Ces changements sont-elles qui conduisent généralement à une perte de la fonction catalytique, ou structurale des protéines affectées (Levine, 2002) (voir fig.6).

Les protéines comportant un pont sulfhydrique sont les plus sensibles aux attaques radicalaires, c'est le cas de nombreuses enzymes antioxydantes et les protéines de transport, qui contiennent très souvent des groupements thiols (SH) (Sen, 2001).

Les protéines modifiées par l'oxydation, vont être prises en charge par des protéines spécifiques dites protéines de stress (**Heat Shock Protein, HSP**) connues pour leur rôle cytoprotecteur, où elles prennent en charge les protéines dénaturées et participent à la restauration de la fonction de ces protéines (Welch, 1992). Les HSP permettent à la cellule de répondre à des stress de façon rapide, et la synthèse des HSP pourrait ainsi compléter les capacités de défenses antioxydantes lorsque les protéines intracellulaires sont endommagées par les ROS (Essig et Nosek, 1997).

### 4.3. Dommages oxydatifs de l'ADN

Les ADN nucléaire et mitochondrial sont également des cibles des EROs. Les altérations les plus communes sont l'hydroxylation des bases puriques et pyrimidiques et du squelette désoxyribose provoquant le clivage des brins et des mutations génétiques (Valko et al., 2006). Ces altérations de la molécule d'ADN peuvent conduire soit à l'arrêt de l'induction de la transcription ou de la transduction des voies de signalisation, soit à des erreurs de réplication, soit à une instabilité génomique et l'ensemble est associé au phénomène de carcinogenèse (Valko et al., 2006).

Une des altérations fréquentes de l'ADN est l'oxydation de la guanine par le radical hydroxyle formant la 8-hydroxy-guanine (8-OHG). Ce produit de l'oxydation de l'ADN peut être facilement dosé dans les urines et est considéré comme un marqueur de carcinogenèse (Valko et al., 2006). Les EROs peuvent également induire des oxydations de l'ADN et le monoxyde d'azote ou le peroxy-nitrite peuvent oxyder la chromatine. De plus, le peroxy-nitrite peut induire la formation de 8-nitroguanine (Kruidenier et al., 2002; Valko et al., 2006). Comme pour les autres composés, la majorité des altérations oxydatives de l'ADN sont induites par le radical hydroxyle. Lorsque le peroxyde d'hydrogène échappe aux enzymes de régulation, il gagne le noyau de la cellule et réagit avec les ions  $\text{Fe}^{2+}$  et  $\text{Cu}^{2+}$  associés à la chromatine produisant ainsi in situ le radical hydroxyle qui attaque l'ADN proche (Kruidenier et al., 2002).

Les aldéhydes réactifs issus de la peroxydation lipidique dont le MDA et le 4-HNE peuvent s'ajouter au groupe amine des bases de l'ADN et constituer ainsi une autre classe de dégâts oxydatifs de l'ADN (Marnett, 1999 ; Nair et al., 1999) (voir fig. 6).

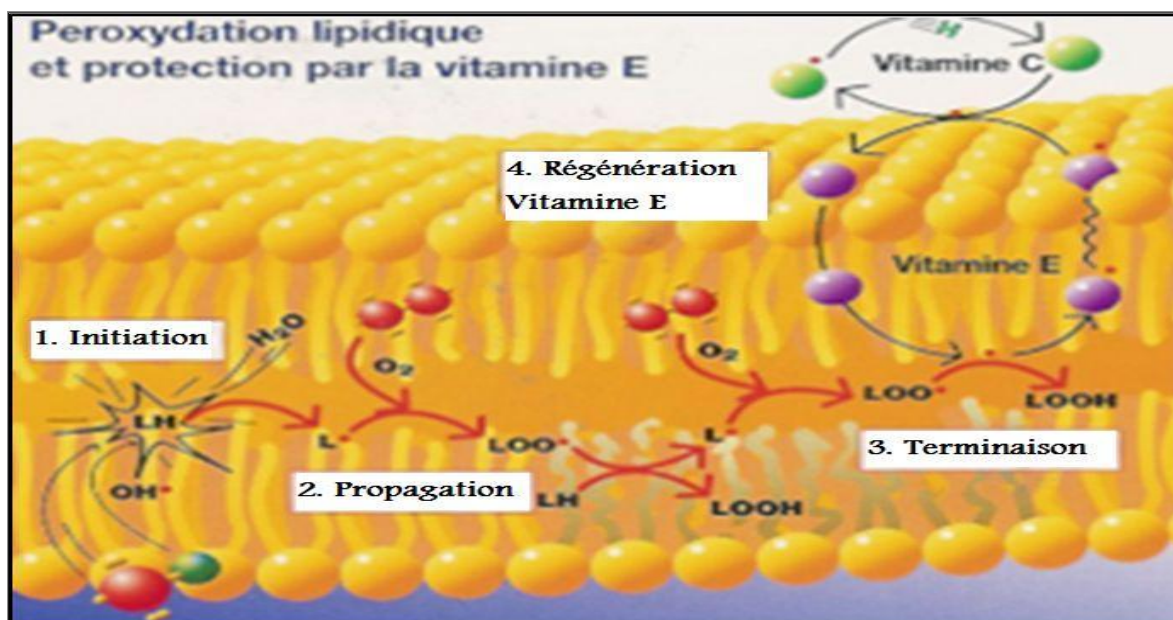


Figure 5. Réactions de la peroxydation lipidique (Daum-badouard, 2006).

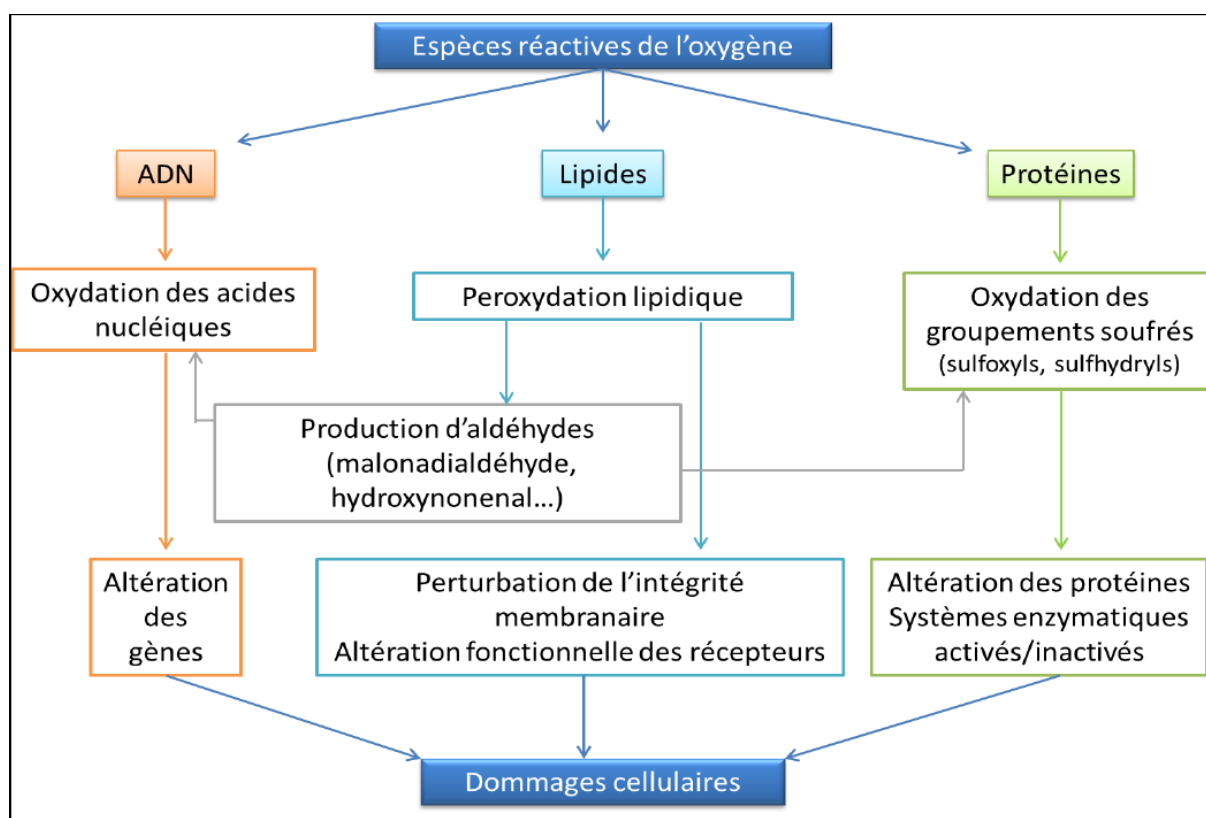


Figure 6. Les différentes cibles des Espèces Réactives de l'Oxygène (Monteil, 2004).

## 5. Implication du stress oxydant dans les pathologies

Le stress oxydant est potentiellement impliqué dans de nombreuses maladies comme facteur déclenchant, ou associé à des complications lors de leur évolution. Ces pathologies peuvent découler d'intoxications chimiques et médicamenteuses, d'exposition à des rayonnements, d'un syndrome d'hyperoxygénation, de phénomènes inflammatoires. La multiplicité des conséquences médicales de ce stress oxydant vient du fait que de nombreux organes ou tissus peuvent devenir la cible d'un stress oxydant (Bonnetfont-Rousselot et al., 2001 ; Sohal et al., 2002 ; Delattre et al., 2005).

Le stress oxydant est impliqué dans le développement des maladies comme : le cancer, les maladies neurodégénératives et le vieillissement accéléré. Il est admis que le stress oxydant est un facteur potentialisant l'apparition de maladies multifactorielles comme les maladies cardiovasculaires, le diabète, et la maladie d'Alzheimer (Montagnier et al., 1998).

Si le stress oxydant est réellement un facteur déclenchant ou participant au déclenchement de ces pathologies, il est logique de penser que la prise d'antioxydant peut retarder, prévenir l'apparition de telles maladies. De même, des études (Holzenberger et al., 2003 ; Delattre et al., 2005) ont montré que le vieillissement s'accompagne d'une diminution des défenses antioxydantes, d'une augmentation de la production des EROs, et d'une diminution des systèmes de réparation et de dégradation des constituants oxydés.

Une étude épidémiologique (Bonnetfont-Rousselot, 2001) a montré très clairement que la consommation régulière des antioxydants permet de diminuer l'incidence de l'apparition d'un stress oxydant et ces maladies.

## II. L'arsenic

L'arsenic est un élément naturel de symbole « As » largement répandu dans la nature, on le trouve en général à l'état de traces dans les roches, le sol, l'air, et les eaux souterraines (Mandal et Suzuki, 2002).

L'arsenic est un métalloïde dont les propriétés chimiques sont intermédiaires entre celles des métaux et celles de non métaux ; sa couleur, sa conductivité électronique et thermique le rapproche des métaux, tandis que son comportement en solution (formation d'anions) le rapproche des non métaux (Laperche et al., 2003).

Les sols et les eaux représentent les principales sources d'ingestion d'arsenic. La présence d'arsenic inorganique dans les eaux destinées à la consommation humaine a été identifiée comme le risque principal pour la santé, L'arsenic est classé par l'organisation mondiale de la santé (OMS) comme un carcinogène puissant (NAS, 1999).

Il existe sous quatre valences (-3, 0, +3 et +5) mais sa forme élémentaire (valence 0) est peu fréquemment rencontrée dans la nature. L'As pentavalent est la forme stable rencontrée dans un environnement oxygéné.

L'arsenic peut exister dans la nature sous deux formes :

- la forme inorganique : l'arséniate (Asi pentavalent ou AsV) et l'arsénite (Asi trivalent ou AsIII).
- La forme organique : essentiellement, l'acide monométhylarsonique (MMA) et l'acide diméthylarsinique (DMA), produits du métabolisme de l'As inorganique, sur le plan toxicologique la forme inorganique est plus toxique que la forme organique (Mandal et Suzuki, 2002 ; Laperche et al., 2003).

### 1. Propriétés physico-chimiques

L'arsenic découvert par Albertus Magnus en 1250, appartient au groupe 15 (ou Va) de la classification périodique des éléments de Mendeleïev donc il possède des propriétés communes avec les éléments de cette famille (Azote, phosphore, bismuth). L'électronégativité de cet élément est trop élevée pour lui conférer un caractère métallique (Matera, 2001). Le tableau 2 résume quelques propriétés physico-chimiques de l'arsenic.

**Tableau 2.** Propriétés physico-chimiques de l'arsenic (Schiferl et Barrett, 1969).

Numéro atomique : 33	Rayon atomique : 125 pm
Symbole atomique : As	Point de fusion : ~817 °C
Masse atomique : 74,9216	Point d'ébullition : 603°C (sublimation)
Configuration électronique : [Ar] 4S <sup>2</sup> 3d <sup>10</sup> 4p <sup>3</sup>	États d'oxydation : 5, 3, -3.

## 2. Les différentes origines de l'arsenic

### 2.1. Origines naturelles

L'arsenic est naturellement présent dans l'environnement, il est un élément ubiquiste que l'on trouve dans l'atmosphère, les sols, les milieux aquatiques et les organismes vivants (Laperche et al., 2003).

Dans les sols, la distribution de l'arsenic varie avec le type de sol et la nature de la roche mère (quantités supérieures dans les roches sédimentaires, par rapport aux roches ignées et métamorphiques) (Smith et al., 2002 ; Smedley et kinniburgh, 2002).

La teneur moyenne de l'arsenic dans la croûte terrestre (lithosphère) à la surface de la terre est comprise entre 1 et 3,4 mg/kg (Mandal et Suzuki, 2002). La concentration moyenne d'arsenic évaluée dans les sols se situe entre 5 et 10 mg/kg (Fengxiang et al., 2003). L'arsenic est également présent dans plus de 200 minéraux, le plus souvent associé à des composés sulfurés ou à certains métaux tels que l'or, l'argent, le cobalt, le plomb, le zinc, ou le cuivre (Mandal et Suzuki, 2002 ; Smedley et Kiniburgh, 2002).

### 2.2. Origines anthropiques

Les activités humaines qui ont contribué aux apports d'As dans les sols et l'environnement sont issues des industries. L'arsenic est ainsi utilisé dans l'agriculture et de nombreuses industries telles que l'industrie du bois, du verre, la fabrication de produits pharmaceutiques, ou la métallurgie (Smith et al., 2002). Les principales utilisations des composés arséniés sont présentées dans le tableau 3.

**Tableau 3.** Principales utilisations des composés arséniés (Nriagu et Azcue, 1990).

Secteurs	Utilisations
Agriculture	Pesticides, insecticides, défoliants, herbicides, raticides, traitement du bois.
Bétail	Compléments alimentaires, prévention de maladies (dysenterie)
Médecine	Traitement de syphilis, de l'amibiase, de perturbations du sommeil.
Electronique	Composition des semi-conducteurs, cellules solaires, montres digitales.
Industrie	Fabrication du verre, céramiques, synthèse de produits pharmaceutiques.
Métallurgie	Alliages non ferreux (agents durcisseurs du cuivre et du plomb), piles et batteries.

Les composés arséniés ont été massivement utilisés dans le domaine agricole (90%) en tant qu'insecticides, fongicides, et herbicides. Dans l'industrie du traitement du bois pour sa conservation, où il est principalement employé sous forme d'arséniates de plomb, de calcium, et de sodium, et surtout sous forme de cuivre chrome arsenic (CCA) (Laperche et al., 2003).

Les formules des espèces arséniés les plus couramment détectées dans l'environnement sont présentées dans la figure 7.

### 3. Toxicité de l'arsenic

La toxicité de l'arsenic a donné lieu à de très nombreuses publications, la toxicité de cet élément ne dépend pas uniquement de l'état d'oxydation mais aussi l'espèce considérée, les formes inorganiques ; l'arsenic trivalent As III, l'arsenic pentavalent AsV sont les formes les plus toxiques, et aussi les plus abondantes dans le milieu aquatique.

Les études épidémiologiques (Tseng et al., 1968 ; Bates et al., 1995 ; Hinwood et al., 1999 ; Ferreccio et al., 2000 ) sur l'ingestion chronique de fortes concentrations d'arsenic mettent en évidence une augmentation du nombre de cancers, affectant tous les organes, aussi bien la peau, le foie, les poumons que les organes internes. Ainsi, les manifestations cliniques sont nombreuses, mais les plus courants sont les lésions de la peau, des mélanomes, des conjonctivites, (Basu et al., 2001), ou bien encore la maladie du « pied noir » (black foot disease), les altérations de la fonction gastro-intestinale



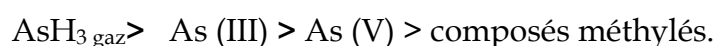
est un risque accru de mortalité liée au diabète chez les populations qui boivent de l'eau potable contaminée par l'arsenic.

Ainsi, l'un des plus désastreux problèmes mondiaux liés à l'arsenic concerne la contamination des eaux souterraines à la fois par les sources géologiques et anthropiques. Il est ainsi estimé que plus de trente millions de personnes ont été exposées aux eaux souterraines contaminées par l'arsenic à différentes teneurs, et qu'au moins 250.000 personnes présentent déjà les symptômes d'une intoxication chronique dans cinq pays du sud-est asiatique (Inde, Bangladesh, Myanmar, Népal, et Thaïlande), le pays le plus touché par cette catastrophe étant le Bangladesh (Causy, 2003).

### 3.1. Spéciation

Le degré de toxicité de l'arsenic est lié à la forme chimique et surtout à l'état d'oxydation sous lequel il se trouve, parmi les formes inorganiques, l'arsenic trivalent AsIII est considéré comme 10 à 60 fois plus toxique que l'AsV (Jain et Ali, 2000). Ces formes inorganiques sont-elles mêmes considérées comme étant plus toxique que les formes méthylées. La transformation biologique d'arsenic inorganique en un composé organique avec un ou plusieurs groupements méthyles, est souvent considérée comme un processus de détoxification (Petrick et al., 2000).

La toxicité de l'arsenic varierait comme suit (Laperche et al., 2003) :



Cependant des études récentes (Aposhian et al., 2000 ; Mass et al., 2001) tendent à contre dire cet ordre de toxicité, car des espèces méthylées d'arsenic trivalent principalement MMA et DMA au degré d'oxydation (III), sont cytotoxiques, génotoxiques, et ont un potentiel inhibiteur plus important sur l'activité enzymatique que l'As (III) inorganique (Rossman, 2003). Mais, la forme la plus toxique de l'arsenic reste le gaz arsine ( $\text{AsH}_3$ ) dont l'inhalation à une teneur supérieure à  $250 \text{ mg.m}^{-3}$  d'air est mortelle quasi-instantanément (Laperche et al., 2003).



### 3.2. Formes inorganiques

#### 3.2.1. L'arsenic pentavalent (As V)

L'arsenic pentavalent est un analogue structural du phosphate qui inhibe la phosphorylation. L'arsenic V (l'arséniate) entrant en compétition avec le phosphore, découple ainsi la phosphorylation oxydative productrice d'ATP, en formant un arséniate d'ester d'ADP instable, qui s'hydrolyse rapidement et se dissocie sans générer ATP. De la même manière, AsV inhibe le métabolisme énergétique par la production de glucose-6-arséniate au lieu de glucose-6-phosphate (voir fig. 10).

L'arséniate pourrait aussi remplacer le phosphate dans la double hélice d'ADN. Un tel phénomène expliquerait la clastogénicité de l'arsenic (car une liaison arsénodiester est instable contrairement aux liaisons phosphodiester) (Mandal et Suzuki, 2002).

#### 3.2.2. L'arsenic trivalent (As III)

Les arsénites sont plus toxiques, plus solubles et plus mobiles que les arsénates. Les formes arsénites sont capables de se fixer aux groupements sulfhydryl (SH, OH) des protéines, dénaturant ou perturbant ainsi le fonctionnement de nombreuses protéines (voir fig. 8) (Gresser, 1981). L'arsenic inhibe des enzymes telles que la pyruvate oxydase, les transaminases. Il interfère aussi avec le métabolisme du glucose et son entrée dans la cellule, il inhibe également la glutathion synthétase, la glucose-6-phosphate déhydrogénase et la glutathion réductase (Bisson, 2002) ; en fait, plus de 200 enzymes humaines seraient inhibées par l'arsenic (Abernathy et al., 1999).

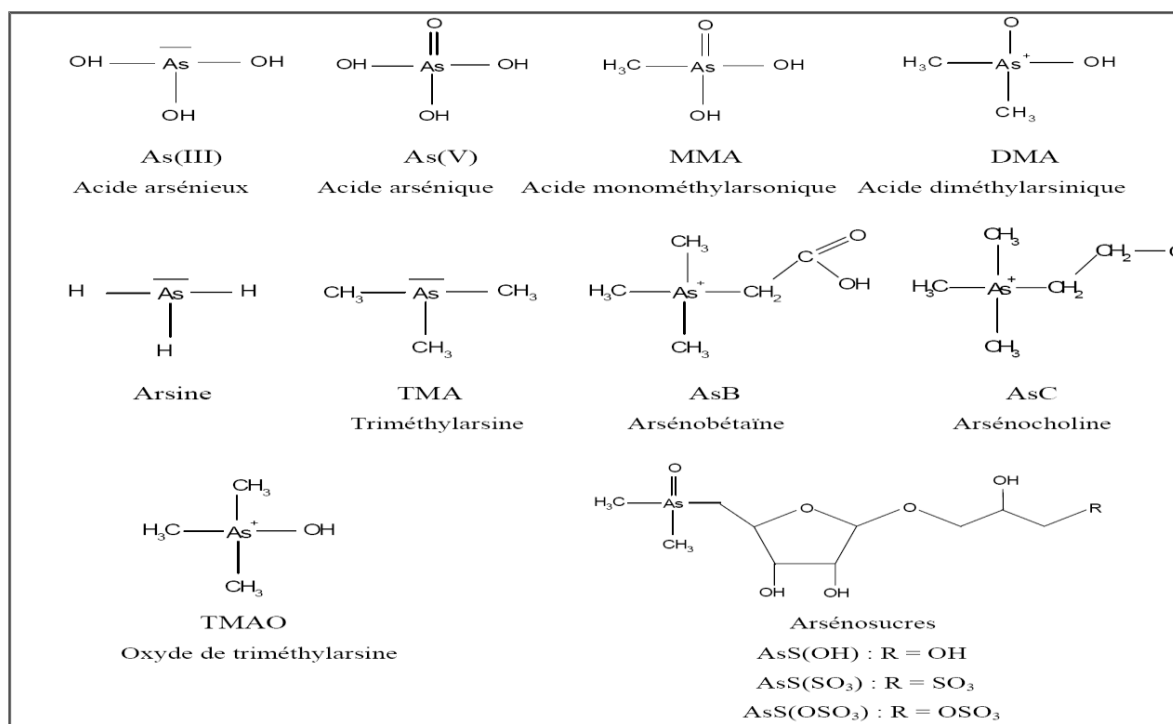


Figure 7. Principales espèces arsénées détectées dans l'environnement (Simeonova et al., 2004).

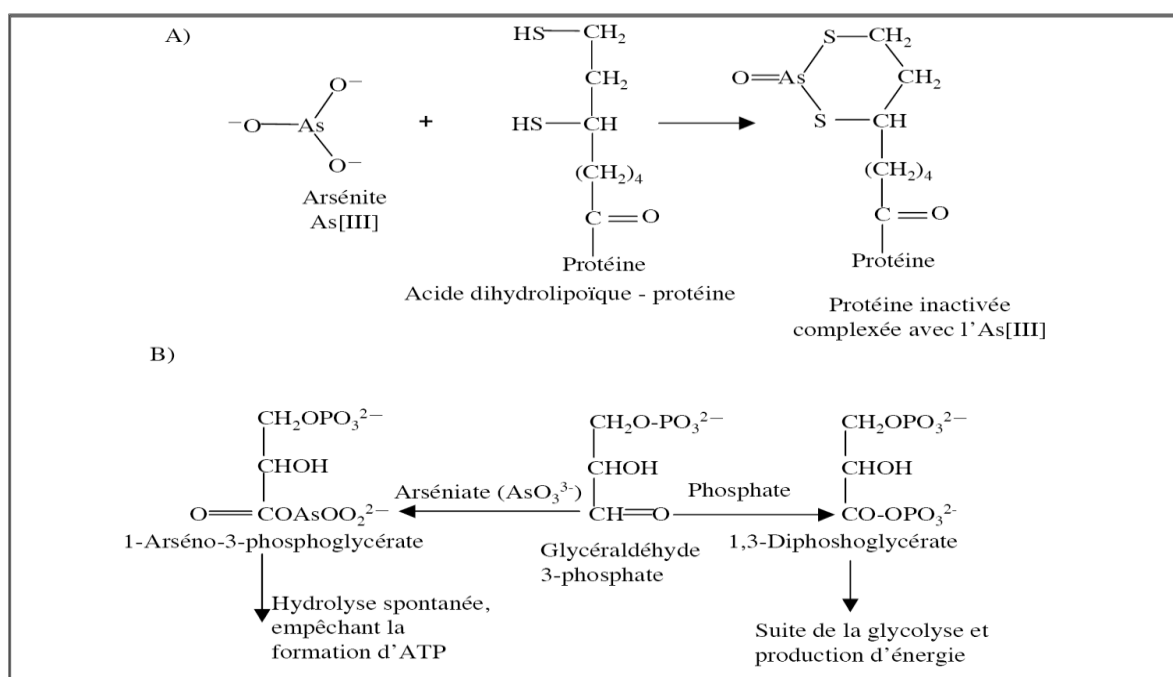


Figure 8. Fixation de As [III] aux groupements SH des protéines et intervention de As [V] dans la glycolyse. A) exemple du mode toxique de As [III] ; B) exemple du mode toxique de As [V] (Mandal et al., 2002).

## 4. La toxicocinétique de l'arsenic

### 4.1. La pénétration dans l'organisme

Les êtres humains sont exposés à l'arsenic par quatre compartiments environnementaux qui sont l'air, l'eau, les aliments et le sol (Caussy, 2003). L'arsenic peut pénétrer dans l'organisme par trois voies principales : **la voie digestive** qui peut être incriminée dans l'intoxication professionnelle, par déglutition après l'inhalation, **la voie respiratoire** qui autorise la pénétration des poussières fines ou des fumées arsenicales et enfin la **voie cutanée**, cette dernière peut-être une voie d'entrer à la faveur de lésion (Viala, 2007). Les composés inorganiques de l'arsenic sont surtout absorbés dans le tube digestif (à peu près 80%) et dans les poumons (environ 10%) et peu absorbé par la peau (Reichl et al., 2010).

### 4.2. La distribution

Après l'absorption, l'arsenic est rapidement distribué dans le sang. Ce sont le foie, les reins qui absorbent la plus grande partie d'As, suivis par la rate, les poumons et le cœur (Reichl et al., 2010), alors que des quantités plus faibles sont présentes dans les muscles et les tissus nerveux (Klaassen, 1996), deux à quatre semaines après l'ingestion d'arsenic, il est incorporé dans les ongles, les cheveux et la peau (Schoolmeester et White, 1980). L'arsenic a peu tendance à s'accumuler dans le lait maternel. Il se fixe principalement aux protéines et à des composés de faibles poids moléculaires renfermant des groupements sulfhydryles (NRC, 1999).

### 4.3. Le métabolisme

Le métabolisme de l'arsenic est généralement associé à une phase de méthylation (Bisson, 2002).

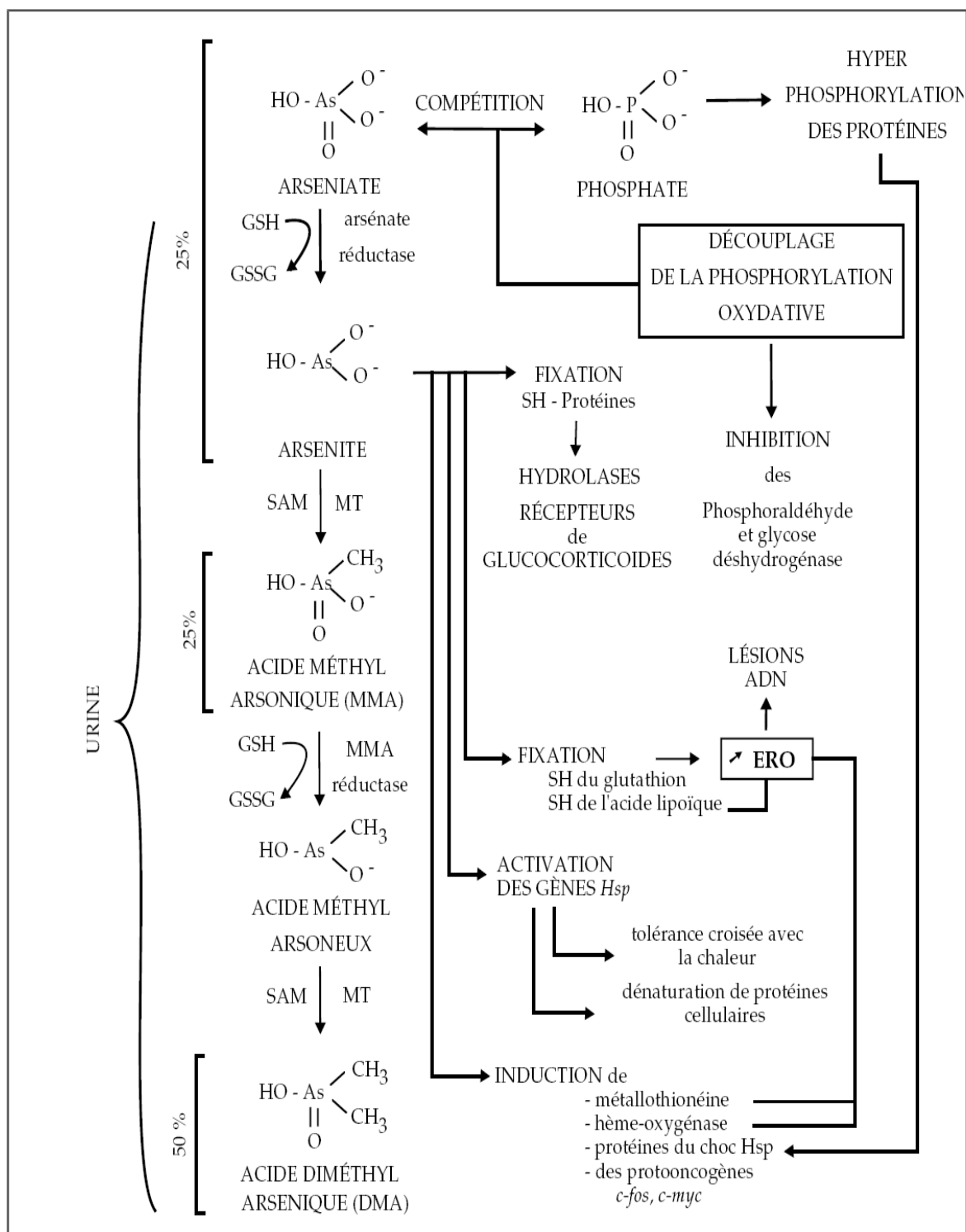
La méthylation de l'arsenic inorganique (se fait principalement au niveau hépatique) se produit après réduction de l'arsenic pentavalent en arsenic trivalent et que la méthylation de cette forme trivalente de l'arsenic découle ensuite de l'addition oxydante d'un groupe méthyle provenant de la S-adénosylméthionine par la méthyltransférase pour former l'acide méthyl arsonique qui est ensuite réduit par le glutathion avant une seconde méthylation qui conduit à l'acide diméthyl arsénique (Mandal et Suzuki, 2002). La biométhylation des formes inorganiques de l'arsenic est

considérée comme un processus de détoxification et donc perçu comme un mécanisme de résistance à l'arsenic (Müller, 2004).

#### 4.4. L'élimination

Après 24 h l'élimination de l'As inorganique se fait principalement par voie rénale 30% et 4% par voie biliaire (Reichl et al., 2010). Dans les urines, on retrouve l'As organique principalement sous forme de DMA (55-75%), et sous forme de MMA (10-20%) et d'As inorganique (10-30%).

Chez les êtres humains, on estime que la demi-vie de l'arsenic inorganique se situe entre deux et quarante jours (élimination de 46 à 63 % de la dose absorbée en 4 à 5 jours) (Bisson, 2002). Le métabolisme de l'arsenic est schématisé dans la figure 9.



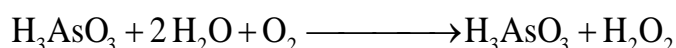
**Figure 09.** Le métabolisme de l'arsenic (Aposhian, 1997).

## 5. L'arsenic et Le stress oxydatif

De nombreuses études mettent en évidence que la présence d'arsenic dans la cellule génère la production des EROs : peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (Barchowsky et al., 1996; Wang et al., 1996 ; Chen et al., 1998), radicaux hydroxylés ( $\text{HO}\cdot$ ) (Wang et al., 1996), oxyde nitrique ( $\text{NO}\cdot$ ) (Gurr et al., 1998), anions superoxydes ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) (Lynn et al., 2000), peroxy diméthylarsinique ( $[(\text{CH}_3)_2\text{AsOO}\cdot]$ ) et radicaux de diméthylarsinique ( $[(\text{CH}_3)_2\text{As}\cdot]$ ) (Yamanaka et al., 1997).

D'autres expérimentations montrent que l'arsenic induit la peroxydation des lipides membranaires, conduisant à la formation de peroxydes lipidiques, ce qui contribue à augmenter le stress oxydatif intracellulaire et amplifie les dommages oxydatifs.

Ces EROs seraient responsables du stress et de la toxicité liés à l'arsenic. Les mécanismes de production de ces composés sont encore mal compris. Une des hypothèses propose que les ROS soient produits lors de l'oxydation de l'As [III], qui, en condition physiologique, produirait du  $\text{H}_2\text{O}_2$  :



Il est important de noter que la méthylation de l'arsenic comporte une succession d'oxydations de l'As III en MM AsV puis du MM AsIII en DM AsV.

Aposhian (1997) et Nesnow et al. (2002) suggèrent que les EROs soient produits lors de l'oxydation du DMA III en DMA V, c'est-à-dire la réduction intracellulaire de la forme pentavalente AsV en une forme trivalente As III conduit à la formation de radicaux libres toxiques pour la cellule .

L'As III peut se complexer aux groupements SH des protéines et contribuer à la diminution de la concentration du glutathion (GSH) et perturber la fonction des groupements thiols (Del Razo et al., 2001) (voir fig. 8).

### 5.1. Induction de protéines de stress

L'arsenic est connu pour induire (directement ou indirectement) un grand nombre de protéines de stress (PS) tels les « heat shock protein » (HSP). Il existe deux grandes catégories de protéines qui répondent à un stress métallique :

Certaines de ces protéines sont membres des HSP, dans le cas des arsénites l'induction de l'HSP 28 peut être la conséquence de l'hyperphosphorylation de la protéine par traitement à l'arsénite (Huang et al., 1995).

La deuxième catégorie de ces protéines de stress : les métallothionines (MTs). Les MTs sont des protéines riches en groupements sulfhydryls qui fixent de nombreux métaux, diminuant ainsi leurs toxicités (Kreppel et al., 1994).

### 5.2. Effets sur l'ADN

Il était supposé que As III inhibe directement les enzymes du système de réparation de l'ADN en se fixant aux groupements sulfhydryls (Del Razo et al., 2001). Cependant, une étude récente montre que As III n'altère pas directement l'activité de ces enzymes (Hu et al., 1998). Ces nouvelles observations soutiennent l'hypothèse que l'As III agit indirectement en induisant un changement de potentiel redox de la cellule.

### III. Le sélénium

#### 1. Propriétés physicochimiques

Le sélénium est le 34<sup>e</sup> élément de la classification périodique de Mendeleïev, de masse atomique égale à 78,96. C'est le 69<sup>e</sup> élément en termes d'abondance des différents éléments sur terre. Il est situé dans la colonne VI (oxygène, soufre, polonium, tellurium) de la classification périodique, il ressemble étroitement au soufre par ses propriétés physicochimiques (Tinggi, 2003; Johansson et al., 2005).

Le sélénium existe sous différents degrés d'oxydation représentés sur le tableau 4. Ses propriétés physicochimiques sont intermédiaires entre celles d'un métal et d'un non métal. Il existe dans les mêmes états de valences que ces éléments (-2, 0, +4, +6) c'est-à-dire sous forme de séléniure, sélénium élémentaire, sélénite, sélénate ainsi que sous des formes organiques, principalement dans les milieux biologiques.

**Tableau 4.** Les principales formes chimiques du sélénium (Simonoff et Simonoff, 1991).

Forme chimique	L'état de valence	Formule
Séléniate	6 <sup>+</sup>	SeO <sub>4</sub> <sup>-</sup>
Sélénite	4 <sup>+</sup>	SeO <sub>3</sub> <sup>-</sup>
Sélénotrisulfure	0	R-S-Se-S-Re
sélénodiglutathion	0	G-S-Se-S-G
Séléniure	2 <sup>-</sup>	Se <sup>-</sup>

#### 2. Sources et les principales formes du sélénium

La répartition de sélénium dans les sols est extrêmement variable depuis les zones pauvres dites séléniprives (< 0,1 µg/g) jusqu'aux zones trop riche dites sélénifères (peut atteindre plus de 1200 µg/g). A partir du sol, l'élément peut-être extrait par les plantes qui le transforment en composés organiques, telle la sélénométhionine. L'apport du sélénium chez l'homme et chez les animaux vient principalement de la nourriture, puis de l'eau. Ainsi, la disparité des teneurs en sélénium dans le sol se répercute sur sa teneur dans les végétaux qui peut varier de 0,1



à 10000 µg/g et par conséquent sur la concentration en cet élément chez l'homme (Maggee et James, 1996).

Le sélénium existe sous différentes formes chimiques. Dans la nature, on trouve l'élément principalement sous forme de sélénures, alors que les formes alimentaires se trouvent exclusivement sous forme de composés organiques et inorganiques et en général inclus dans des protéines animales ou végétales ; sélénométhionine (SeMet), sélénocystéine (SeCyst), S-méthylsélénocystéine, sélénohomocystéine (Simonoff, 1990; Ducros et Favier, 2004).

### 3. Utilisation industrielle du sélénium

Les applications industrielles du sélénium sont nombreuses, il est utilisé dans la fabrication du verre en tant que colorant rouge sous forme de sélénite d'ammonium, mais également comme agent de décoloration pour neutraliser la coloration des oxydes de fer. Ses propriétés pigmentaires sont également utilisées dans l'industrie des peintures et des plastiques (Fishbein, 1991 ; Haygarth, 1994). Dans l'industrie des pneumatiques, il est utilisé pour augmenter la résistance du caoutchouc lors du processus de vulcanisation mais aussi en métallurgie dans la préparation d'alliages et le traitement de surfaces. Ses propriétés photoélectriques sont largement exploitées en électricité et en électronique (fabrication de cellules photo-électriques, de semi-conducteurs, de tambours de photocopieurs). En agriculture, le sélénium est utilisé dans la fertilisation et comme additif alimentaire pour le bétail dans les régions pauvres en sélénium (Simonoff et Simonoff, 1991).

### 4. Métabolisme du sélénium

Le métabolisme du Se est conditionné à la fois par la forme chimique qui se présente dans la nourriture ainsi que par l'état nutritionnel (apports de Se journaliers insuffisants, adéquats ou excessifs). De plus, l'apport peut être affectée par la présence d'autres composants, y compris le soufre, métaux lourds, et des vitamines (Navarro-Alarcon et Cabrera-Vique, 2008).

**L'absorption** intestinale du sélénium est élevée (50-95%) et dépend de la forme chimique. La sélénométhionine est majoritairement absorbée (90% d'absorption) au niveau du duodénum par un transport actif selon un mécanisme similaire à celui de la méthionine, alors que l'absorption du sélénite est réalisée par un transport passif (60% d'absorption) (Simonoff et Simonoff, 1991 ; Reilly, 2006).

Le sélénium absorbé est transporté par des protéines plasmatiques de la circulation pour être distribué dans l'organisme. Certains organes, comme le foie (15%), les reins (5%), le cerveau (1%) et le pancréas (0,5%), accumulent spécifiquement le sélénium (Thomson et Stewart, 1974). Dans le métabolisme du sélénium, le foie constitue une réserve d'échange rapide avec le sang alors que les réserves dans le muscle constituent un stockage d'échange lent (Simonoff et Simonoff, 1991).

La biodisponibilité relative du Se issu de la forme organique est plus élevée par rapport à celle du Se issu de la forme inorganique (Pehrson et al., 1999).

➤ **Le métabolisme** du sélénium dépend de la forme chimique ingérée. Les espèces inorganiques sont réduites par le glutathion pour rejoindre le pool de sélénite alors que les espèces organiques (Se-Met, Se-Cys) sont biotransformées par la  $\beta$ -lyase ou la  $\gamma$ -lyase (Suzuki et Ogra, 2002 ; Fox et al., 2004). Le Se sous forme de sélénite est ensuite incorporé dans la synthèse protéique (Janghorbani et al., 1999). La Se-Met peut également être intégrée de façon inchangée dans les protéines à la place de la méthionine pour produire des sélénoprotéines (Schrauzer, 2000 ; Combs, 2001; Suzuki et Ogra, 2002).

➤ **L'excrétion** du sélénium se fait par voie urinaire, fécale, respiratoire, colostrale et lactée. Les voies urinaire et fécale sont les principales voies d'excrétion du Se. Le Se se retrouve sous forme méthylée (méthylsélénol, diméthylsélénium et triméthylsélénonium) dans l'urine (Foster, 1986) et le rein peut excréter jusqu'à 60% du Se (Lebreton et al., 1998). L'excrétion biliaire du Se peut constituer jusqu'à 28% de l'ensemble du Se ingéré (Langlands et al., 1986) alors que le lait tout comme la voie respiratoire restent des voies secondaire d'excrétion du Se. Le transfert du Se dans le lait est plus efficace qu'à travers le placenta (Hidiroglou et al., 1985; Zachara et al., 1993) (voir fig. 10).

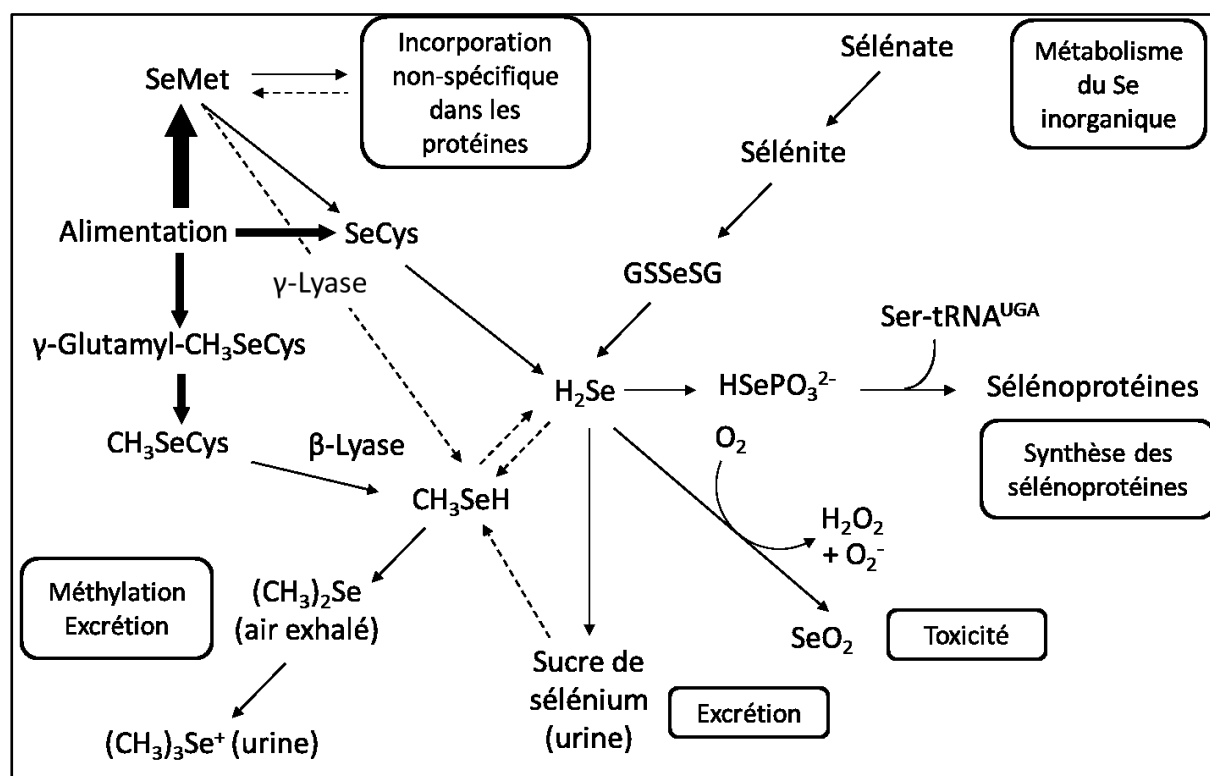


Figure 10. Schéma simplifié du métabolisme cellulaire du sélénium (Rayman et al., 2008).

## 5. Importance biologique du sélénium

### 5.1. Le rôle antioxydant des sélénoprotéines et enzymes sélénodépendantes

Les effets bénéfiques du Se sont directement liés à son intégration dans différentes protéines (les sélénoprotéines et les enzymes sélénodépendantes) sous la forme d'un cofacteur ou d'un acide aminé. Parmi ces composés :

#### ✓ La glutathion peroxydase (GPx)

La GPx contient de sélénium (chaque molécule de glutathion peroxydase contient 4 molécules de sélénium) dans son site actif sous la forme d'un résidu sélénocystéine. La GPx détient un rôle principal qui consiste à catalyser la réduction des peroxydes d'hydrogène par le glutathion (Van Cauwenbergh et al., 2004). Cette réaction de réduction permet ainsi d'empêcher la peroxydation lipidique qui serait un des effets en lien avec la toxicité de l'arsenic.

### ✓ Thiorédoxine réductase (TR)

Le sélénium présent également au niveau du site actif de la thiorédoxine réductase sous forme de groupement séléinol (-SeH) où le sélénium joue un rôle fondamental dans la protection contre les radicaux libres (Tapiero et al., 2003).

La thiorédoxine réductase est située dans le cytoplasme des cellules et catalyse la réduction de la thiorédoxine, qui est une protéine de faible PM responsable de la réduction de biomolécules oxydées. La réduction de la thiorédoxine serait un mécanisme important de régulation de la croissance cellulaire normale ou tumorale, mais aussi de la mort cellulaire programmée (Ducros et Favier, 2004).

### ✓ Sélénoprotéine P (Sel-P)

Elle est principalement localisée dans le plasma et a la particularité de posséder 10 atomes de Se par polypeptide. Sa fonction n'a pas encore été élucidée. On lui attribue plusieurs rôles : la Sel-P agirait comme antioxydant des cellules endothéliales en réduisant les peroxynitriles (ONOO-) (Navarro-Alarcon et Cabrera-Vique, 2008), en plus du maintien de l'homéostasie à la suite du transport dans les différents organes (Burk et al., 2003) et une activité peroxydase spécifique des phospholipides (Ducros et Favier, 2004).

Le sélénométhionine, acide aminé présent en faible quantité dans les protéines à la place de la méthionine, pourrait également catalyser la réduction du peroxy-nitrite à la place du glutathion, intervenant ainsi dans le stress oxydant (Klotz et al., 2003).

## 5.2. Autres rôles biologiques

De nombreuses études épidémiologiques ou expérimentales chez l'humain ont mis en évidence une association inverse entre la présence de Se et plusieurs maladies.

- Le Se a été identifié comme agent anticancéreux en agissant sur les réactions redox et antioxydantes qui auraient un effet sur l'initiation du cancer et en ralentissant la progression (Combs et al., 2001). De ce fait, il serait possible, en administrant des doses de Se au niveau supra-nutritionnel, de ralentir la formation de cellules cancéreuses (Whanger, 2004). Parmi les mécanismes proposés ; l'activation du gène p53 suppresseur de tumeur par la Se-Met et l'induction de l'apoptose des cellules cancéreuses (Abdulah et al., 2005; Wallace et al., 2009), ou bien par augmentation de la

réponse immunitaire primaire, en protégeant les cellules contre les oxydations aberrantes, et en diminuant la formation de métabolites cancérogènes. (Simonoff et Simonoff, 1991).

- Le sélénium est un immunomodulateur. A dose faible il stimule le système immunitaire, mais à dose élevée, il l'inhibe. A dose physiologique il stimule la formation des anticorps et l'activité de nombreuses cellules immunocompétentes telles que les lymphocytes T auxiliaires, T cytotoxiques, les cellules NK, (Burk, 1994).
- Le sélénium intervient également dans le métabolisme des hormones thyroïdiennes. C'est en effet une protéine contenant du sélénium qui catalyse la transformation de la thyroxine T4 en une T3, laquelle est la forme hormonale active au niveau tissulaire (Kohrle, 1999, 2000).

### 5.3. Interaction avec les minéraux

Le sélénium est capable d'interagir dans l'organisme avec de nombreux minéraux comme As, Cd, Hg, Cu, Ag et Pb. De ce fait, il est susceptible de moduler leur toxicité à divers degrés. Les effets les plus puissants semblent être la prévention des dommages testiculaires, la réduction de la mortalité, de la teratogénécité, de la cardiotoxicité et de l'effet hypertenseur induits par le cadmium; des atteintes rénales et neurologiques dues aux composés inorganiques et organiques du mercure, et des atteintes rénales induites par le platine utilisé dans le traitement du cancer (Neve et al., 1987 ; Diplock et al., 1985) parmi les mécanismes avancés pour expliquer ces effets, on retrouve souvent la formation de séléniures biologiquement inactifs qui s'accumulent sous forme de granules dans certains organes; la liaison favorisée par le sélénium de certains métaux (Hg, Cd) sur des protéines moins critiques après formation de groupes sélénotrisulfures de forte affinité pour ces minéraux toxiques, ou encore des interférences métaboliques, comme avec l'arsenic, qui est métabolisé d'une manière proche de celle du sélénium. Ces interactions, qui ont été souvent étudiées avec des concentrations élevées en éléments minéraux se produiraient également avec des concentrations physiologiques en sélénium qui s'avéreraient dès lors suffisantes pour la détoxification des métaux dans certaines limites de concentrations (Magos et al., 1987).

## 6. Apport supplémentaire et toxicité

Les effets toxiques du sélénium ont été connus bien avant son rôle essentiel, il faut admettre qu'ils ne causent que peu de problèmes. La marge entre la dose nutritionnelle ou thérapeutiques et la dose toxique est très étroite (Hodson et Hilton, 1983; EPA, 2004). Des auteurs ont tenté d'établir des normes de consommation régulière en sélénium par voie alimentaire en se basant sur plusieurs critères. Certaines proposent comme valeur maximale un apport de 5 µg/kg/jour sur de longues périodes. D'autres, se basant sur la consommation en poissons (riches en sélénium), admettent que des apports de 500 µg Se/ jour sont inoffensifs.

La dose létale (DL<sub>50</sub>) est fixée chez l'homme entre 500 mg et 1 g de sélénium sous forme minérale (sélénite ou sélénate de sodium). La dose journalière la plus basse entraînant des signes de toxicité (une chute des cheveux et des ongles, un état dépressif et de la fatigue) se situe aux environs de 2400 et 3000 µg (Thérond et al., 1997).

En pathologie humaine, il y a peu d'intoxications au Se, par contre les carences en sélénium peuvent avoir comme conséquence une cardiomyopathie comme la maladie de Keshan (une maladie dégénérative cardiaque). De nombreux travaux ont montré qu'un apport suffisant journalier en sélénium permet de traiter ou de prévenir le développement de nombreuses pathologies (syndrome de Keshan et la nutrition parentérale) (Ducros et Favier, 2004).

Le sélénium s'avère donc être indispensable à la vie. Les besoins journaliers en sélénium nécessaires à un homme adulte ont été estimés à 50-200 µg. Les apports alimentaires en sélénium sont essentiellement fournis par les céréales, les champignons, les viandes rouges et abats, le poisson et les œufs dont les teneurs en sélénium varient en fonction de la disponibilité et de l'abondance de l'oligo-élément dans l'environnement d'origine. Toutefois, la dose minimale et surtout les formes sous lesquelles elles sont apportées sont l'objet de nombreux débats, notamment en ce qui concerne les suppléments alimentaires (Rayman, 2004).

#### IV. *Pistacia lentiscus*

##### 1. Description botanique de *Pistacia lentiscus*

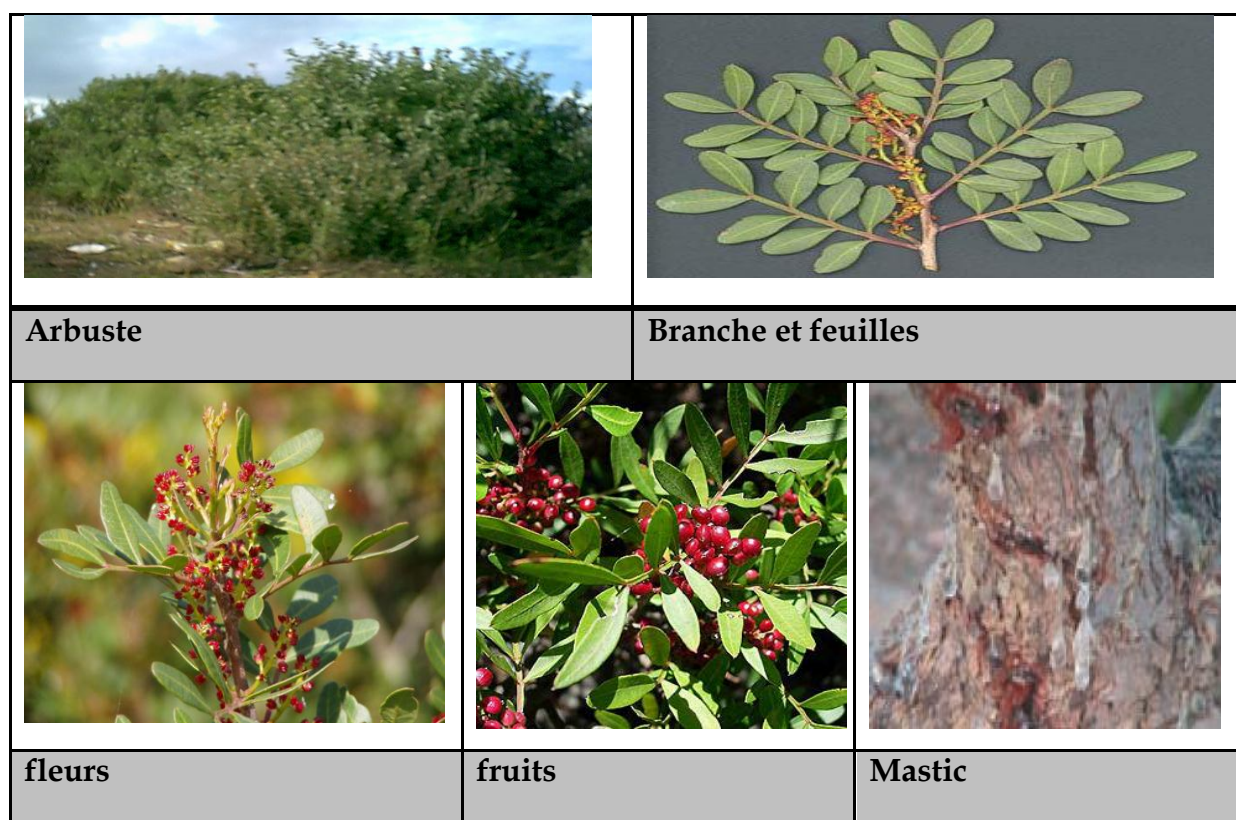
Le *Pistacia lentiscus* communément appelé arbre à mastic ou lentisque (Darou en arabe local) de la famille des Anacardiaceae (Pistaciaceae) est un arbrisseau vivace de trois mètres de hauteur, ramifié, à odeur de résine fortement âcre (Belfadel, 2009 ; Boukeloua, 2009). On le trouve couramment en sites arides Asie et région méditerranéenne de l'Europe et d'Afrique, jusqu'aux Canaries (Bellakhdar, 2003). *Pistacia lentiscus* pousse à l'état sauvage dans la garrigue et sur les sols en friche. En Algérie, le lentisque se trouve sur le long du tell et dans les zones forestières (Smail-Saadoun, 2002), plus précisément dans le bassin du Soummam en association avec le pin d'Alep, le chêne vert et le chêne liège (Belhadj, 2000).

*Pistacia lentiscus* est caractérisé par :

- ❖ **Ecorce** : Rouge âtre sur les jeunes branches et vire au gris avec le temps. Quand on incise l'écorce la plante laisse s'écouler une résine irritante non colorée à odeur forte.
- ❖ **Branches** : Les branches tortueuses et pressées, forment une masse serrée.
- ❖ **Feuilles** : Sont persistantes, composées, et possèdent un nombre pair de folioles (4 à 10) d'un vert sombre, elliptiques, obtuses, luisantes en dessus, coriaces et dont le pétiole est bordé d'une aile verte. On trouve des pieds mâles et femelles distincts (espèce dioïque) qui fleurissent en grappes denses en mois de Mai.
- ❖ **Fleurs** : Les fleurs unisexuées d'environ 3 mm de large se présentent sous forme de grappe, Elles apparaissent au printemps et sont très aromatiques, forment des racèmes de petite taille à l'aisselle des feuilles. On différencie les fleurs femelles des fleurs mâles grâce à leur couleur, vert jaunâtre pour les femelles et rouge foncé pour les mâles. Les fleurs mâles et femelles poussent sur des arbustes différents, les mâles ont 5 petits sépales dont émergent 5 étamines rougeâtres reposant sur un disque nectarifère. Les femelles à 3 ou 4 sépales à un ovaire supère avec un style court à 3 stigmates.



- ❖ **Fruit** : Est une baie globuleuse (de 2 à 3 mm) monosperme, remplie par nucléole de la même forme; d'abord rouge, il devient brunâtre à sa maturité, qui est complète l'automne.
- ❖ **Mastic** : Si l'on incise le tronc de ce végétal, il s'en écoule un suc résineux nommé mastic qui une fois distillé, fournit une essence employée en parfumerie (Voir fig. 11).



**Figure 11.** Description botanique de *Pistacia lentiscus* (Belfadel, 2009).



## 2. Classification taxonomique de *Pistacia lentiscus*

**Règne :** *Plantae*

**Embranchement :** *Tracheobionta*.

**Super-division :** *Spermatophyta*.

**Division :** *Magnoliophyta*.

**Classe :** *Magnolopsida*.

**Sous classe :** *Rosidae*.

**Ordre :** *Sapindales*.

**Famille :** *Anacardiaceae*.

**Genre :** *Pistacia*

**Espèce :** *Pistacia lentiscus*.

## 3. Composition en métabolite secondaire et les effets biologiques et thérapeutiques de *Pistacia lentiscus*

Le *Pistacia lentiscus* est connu pour ses propriétés médicinales depuis l'antiquité, il est utilisé pour le traitement de l'eczéma, la paralysie, diarrhée, les infections de la gorge, la jaunisse, l'asthme, les douleurs d'estomac et des calculs rénales (Chief, 1982 ; Mouhajir et al., 2001). Les diverses parties contiennent une variété de composés chimiques qui sont médicalement importantes.

### 3.1. Les feuilles

Les feuilles sont prélevées à n'importe quel moment de l'année, l'infusion des feuilles a un effet diurétique, astringent et emménagogue (Bellakhdar, 1978), en décoction, ont des effets stomachiques, mucilagineuses et agissent contre les maux du foie et la fièvre (Kahouadji, 1995), elles traitent aussi l'hypertension.

En effet, trois grandes classes de métabolites secondaires ont été détectées dans les feuilles de *P. lentiscus*; acide gallique et dérivés galloyls, Anthocyanes et les glycosides de flavonol comme les glucosides de quercetine et de myricetine qui ayant une capacité antioxydante (Piluzza et Bullitta, 2011).

### 3.2. Le Mastic (Résine)

Le mastic est une résine obtenue par incision de l'écorce de cet arbre, la résine durcit au contact de l'air qui est appelée mastic ou gomme mastic d'où son nom commun d'arbre à mastic (Seigue, 1985 ; Wolfgang, 2007). Elle contient des alphas et des bêta masticorésines, des tanins, de la masticine et de l'acide masticique (Iserin, 2001). A partir de la résine une huile essentielle a été isolé, riche en monoterpènes, des monoterpénols, des sesquiterpène, et des esters terpéniques (Baudoux, 2003 ; Grosjean, 2007) et des pinènes, qui sont très antiseptiques (Iserin, 2001). La résine de lentisque est peu employée aujourd'hui, mais elle est très efficace contre les infections bronchiques, la toux et pour traiter la diarrhée. On l'a aussi appliquée sur les ulcères et les furoncles. La résine mélangée à d'autres composants est sert de pansement dentaire provisoire (Iserin, 2001 ; Wolfgang, 2007). Le mastic est aussi utilisé comme une gomme à mâcher, pour protéger les lèvres contre la sécheresse, traiter certaines maladies d'estomac et comme antiseptique pour le système respiratoire (Baytop, 1999 ; Tulzaci et Aymaz, 2001).

### 3.3. Les fruits

Selon Luigia et ses collaborateurs. (2007), les fruits de *Pistacia lentiscus* contiennent 5,4 mg/ml d'anthocyanines, essentiellement : cyanidine 3-O-glucoside (70%), delphinidine 3-O-glucoside (20%) et cyanidine 3-O-arabinoside (10%). De plus, des polyphénols ; l'acide gallique, le pentagolloylylucose (Abdelwahed et al., 2006) et l'acide digallique (Behouri et al., 2011) qui lui confèrent une capacité antioxydante importante (Luigia et al., 2007).

Les travaux réalisés par Hamad et ses collaborateurs. (2011) ont montré aussi que les protéines représentent 5% du poids des fruits de *Pistacia lentiscus*.

La composition minérale de ces fruits montre que la teneur en potassium est la plus élevée (2,67%), alors que celles du sodium, calcium et phosphore sont de : 0,46, 0,37 et 0,004 % respectivement.

### 3.4. Huiles essentielles

L'étude chimique sur les huiles essentielles de *Pistacia lentiscus* a montré la richesse en monoterpène et les sesquiterpènes.

L'huile essentielle des feuilles de *Pistacia lentiscus* contient  $\beta$ -caryophylline (31,38%), germaerene (12,05%) et  $\gamma$ -cadinène (6,48%) (Nahida et al., 2012). Quelques sesquiterpènes, esters aliphatique, cétones et des composés phénoliques (thymol et carvacrol) ont été aussi identifiés (Congiu et al., 2002).

La médecine traditionnelle algérienne utilise les huiles essentielles du lentisque pour les effets pharmacologiques en tant qu'antispasmodique, ou comme un remède d'application local externe sous forme d'onguent pour soigner les brûlures et les douleurs dorsales (Arab et Bouchenak, 2014)

L'huile essentielle est aussi employée par voie orale contre les problèmes respiratoires d'origine allergique et les ulcères de l'estomac (Boukeloua, 2009)

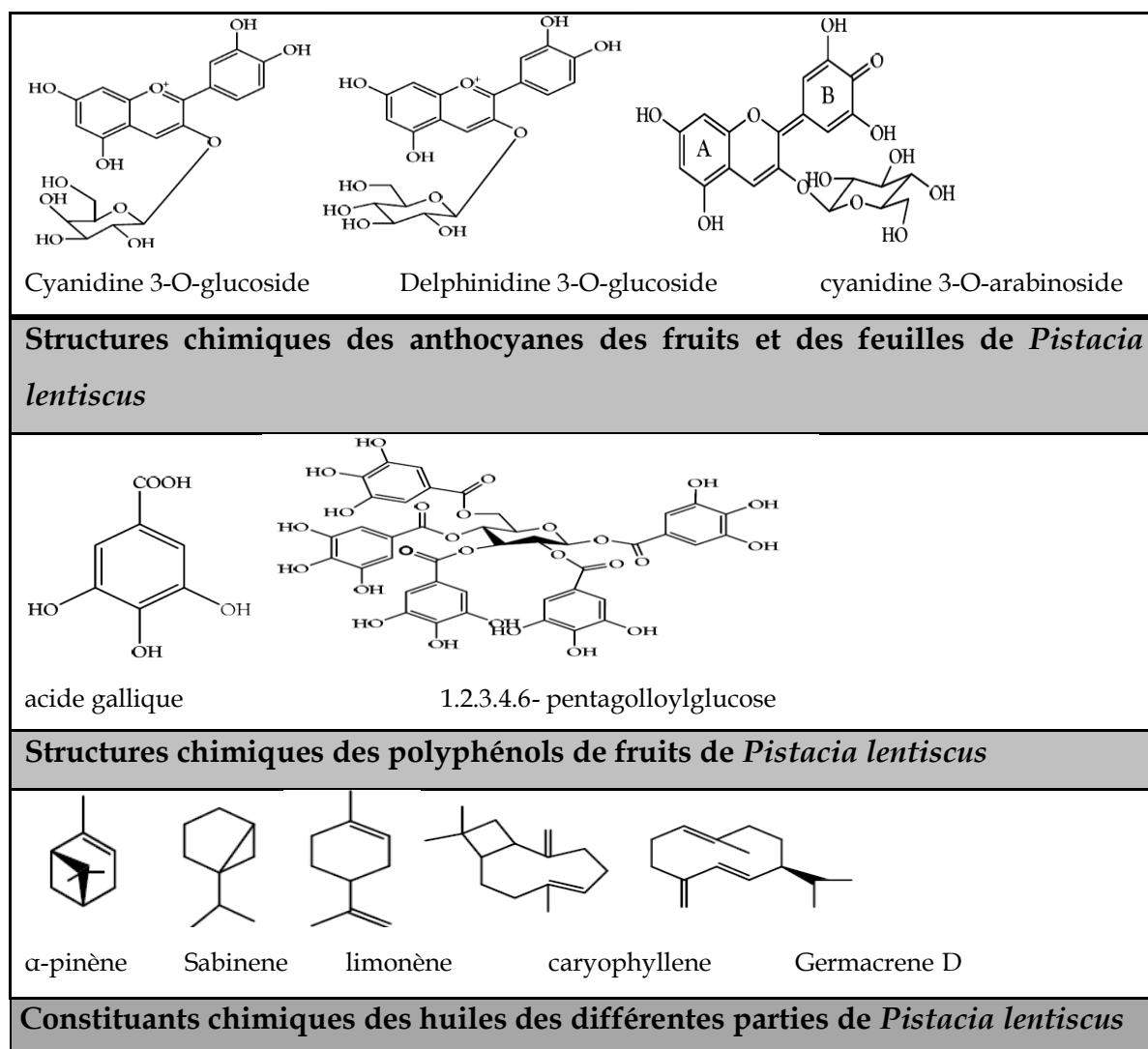
### 3.5. Huile fixe (huile de lentisque)

L'huile de lentisque (dont les baies peuvent fournir 38,8 % du poids des fruits, elle contient 53% d'acide gras monoinsaturé) est de couleur verte foncée ; elle n'est entièrement liquide qu'à la température de 32 et 34 °C, au-dessous elle laisse déposer une matière blanche, susceptible de cristallisation qui bientôt envahit la totalité de l'huile et la solidifie complètement.

Des études sur l'huile de lentisque ont montré leur richesse en acides gras insaturés et saturés tels que l'acide oléique, l'acide palmitoléique, l'acide linoléique, l'acide palmitique et l'acide stéarique, (Charef et al., 2008 ; Trabelsi et al., 2012 ; Dhifi et al., 2013; Djerrou, 2014), les polyphénols compris les flavonoïdes et d'autres composés phénoliques comme l'acide gallique (Zhao et al., 2005; Bhourri et al., 2010),  $\alpha$ -tocophérol (Kivçakand Akay, 2005; Dhifi et al., 2013), les monoterpènes (Gardeli et al., 2008) et les stérols comme ; le  $\beta$ -sitostérol (90%), le camestérol, le cholestérol et le stigmastérol (Trabelsi et al., 2012).

Cette huile donc a une bonne qualité nutritive en raison de sa teneur en acides gras insaturés et saturés et constitue un produit apprécié pour ses usages thérapeutiques dans le traitement des ulcères de l'estomac, des bronchites, la cicatrisation des plaies et comme un antiseptique (Mezghani, 1992 ; Rejeb et al., 2006 ; Mezni et al., 2012).

La composition en métabolite secondaire de différentes parties de *Pistacia lentiscus* est schématisée dans la figure 12.



**Figure 12.** Composition en métabolite secondaire de différentes parties de *Pistacia lentiscus* (Belfadel, 2009).

---

**PARTIE PRATIQUE**

**CHAPITRE I :  
MATÉRIEL ET MÉTHODES**

---



## I. Matériel et méthodes

### 1. Les produits chimiques

Arsénite de sodium ( $\text{NaAsO}_2$ ), glutathion (GSH), 5,5-dithiobis-2 nitro acide benzoïque (DTNB), nitro-bleu tétrazolium (NBT) et tous les autres produits chimiques utilisés dans l'expérimentation ont été achetés auprès de Sigma (St. Louis, France).

### 2. Matériel végétal

Les baies mures de *Pistacia lentiscus* ont été récoltées en Décembre 2012 dans la région de Chétaibi (wilaya d'Annaba). Ces baies sont servies à l'extraction d'huile de lentisque (*Pistacia lentiscus* oil, PLo). Celle-ci a été réalisée par une méthode traditionnelle par un artisan au niveau du village de Chétaibi.

#### 2.1. Mode d'obtention de l'huile

Après la récolte, les fruits mûres sont broyées à l'aide de broyeur de pierre, la pâte est ensuite bien mélangée par les mains ou les pieds, puis laissée au repos pour une nuit. Le lendemain, l'eau froide est ajoutée à cette pâte puis enlevée la partie supérieure et placée sur le feu pour chauffer jusqu'à ce qu'elle commence à bouillir. Par la suite, mise dans un tissu et pressée par les mains séparant la phase liquide des tourteaux, la phase liquide est chauffée jusqu'à l'évaporation totale de l'eau, l'huile est ainsi récupérée, filtrée puis stockée (Djerrou et al., 2010 ; Mezni et al., 2012).

#### 2.2. Mesure des paramètres physico-chimiques de l'huile de *Pistacia lentiscus*

Les tests de détermination des paramètres physico-chimiques de l'huile de *Pistacia lentiscus* (densité, indice de réfraction, acidité, indice de peroxyde et indice de saponification) ont été réalisés au niveau du laboratoire de contrôle de qualité et répression des fraudes d'Annaba.

Les paramètres physico-chimiques mesurés et les méthodes utilisés sont résumés dans le tableau 5.

**Tableau 5.** Type et normes des différentes déterminations physico-chimiques

Type d'analyse	Norme Algérienne
Détermination de la densité relative à 20°C	NA.271/1992
Détermination de l'indice de réfraction à 20°C	NA.278/1992
Détermination de l'indice d'acide et d'acidité	NA.273/1992
Détermination de l'indice de saponification	NA.274/1992
Détermination de l'indice de peroxyde	N° 11 95 04

Les protocoles de détermination des divers paramètres sont détaillés en annexes.

### 3. Matériel biologique et conditions d'élevage

Dans cette étude, nous avons utilisé 56 rats blancs mâles *Rattus rattus* de la souche Wistar, provenant de l'institut pasteur d'Alger. Ces rats ont été soumis à une période d'adaptation d'un mois environ, aux conditions de l'animalerie; à une température de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  et une photopériode naturelle.

Les rats sont élevés dans des cages en polyéthylène qui sont tapissées d'une litière constituée de copeaux de bois. Les cages ont été nettoyées et la litière changée tous les jours jusqu'à la fin de l'expérimentation. Ils ont été nourris avec un concentré énergétiquement équilibré, dont la composition est détaillée dans le tableau 6.

**Tableau 6.** Composition de l'alimentation pour 1 kilogramme d'aliment (ONAB).

Matière alimentaire	Quantité en g/kg d'aliment	Pourcentage (%)
Mais	620	62
Soja	260	26
Phosphate	16	1.6
Calcaire	9	0.9
Cellulose	10	1.0
Minéraux	10	1.0
Vitamines	10	1.0

## 4. Traitement des rats

### 4.1. Expérimentation 1

Dans la première expérimentation, nous avons utilisé 28 rats âgés de 8-9 mois, d'un poids vif moyen de 270 g, ont été répartis en 4 groupes de 7 rats chacun, il s'agit de :

**Groupe 1** : rats témoins ont reçu une eau physiologique par injection intra- péritonéale chaque jour pendant 21 jours.

**Groupe 2** : rats traités par le sélénite de sodium  $\text{Na}_2\text{O}_3\text{Se}$  dissout dans l'eau distillée. Le sélénite de sodium est administré aux rats par voie orale à raison de 3 mg/kg de poids corporels chaque jour pendant 21 jours.

**Groupe 3** : rats traités par l'arsénite de sodium  $\text{NaAsO}_2$  dissout dans l'eau physiologique. L'arsénite de sodium est administré aux rats par injection intrapéritonéale à raison de 5,55 mg/kg de poids corporel chaque jour.

**Groupe 4** : rats traités par l'arsénite de sodium  $\text{NaAsO}_2$  avec la même dose que celle du groupe 3 avec la supplémentation quotidienne par voie orale en sélénite de sodium  $\text{Na}_2\text{O}_3\text{Se}$  à raison de 3 mg/kg de poids corporel pendant 21 jours.

### 4.2. Expérimentation 2

Dans la deuxième expérimentation les 28 rats âgés de 3-4 mois, d'un poids vif entre de 210-240 g, ont été répartis équitablement en 4 groupes, où le 2<sup>ème</sup> et le 4<sup>ème</sup> groupes sont premièrement prétraités par 3,3 ml/kg de poids corporel d'huile de lentisque par contre, le 1<sup>er</sup> et 3<sup>ème</sup> groupes ont reçu un régime standard pendant 14 jours.

Après 14 jours de prétraitement les 4 groupes sont poursuivi le traitement comme suit :

**Groupe 1** : rats témoins ont reçu une eau physiologique par injection intra- péritonéale.

**Groupe 2** : rats traités par l'huile de *Pistacia lentiscus* (P<sub>Lo</sub>) à raison de 3,3 ml/kg de poids corporel. L'huile de *Pistacia lentiscus* est administrée aux rats par gavage chaque jour pendant 21 jours.

**Groupe 3** : rats traités chaque jour pendant 21 jours par l'arsénite de sodium ( $\text{NaAsO}_2$ ) par injection intrapéritonéale à raison de 5,55 mg/kg de poids corporel.

**Groupe 4** : rats traités par la combinaison de 5,55 mg/kg PC d'arsénite de sodium plus 3,3 ml/kg PC d'huile de *Pistacia lentiscus* (P<sub>Lo</sub> +  $\text{NaAsO}_2$ ) chaque jour pendant 21 jours.



## 5. Sacrifices et prélèvements des organes

### 5.1. Prélèvement sanguin

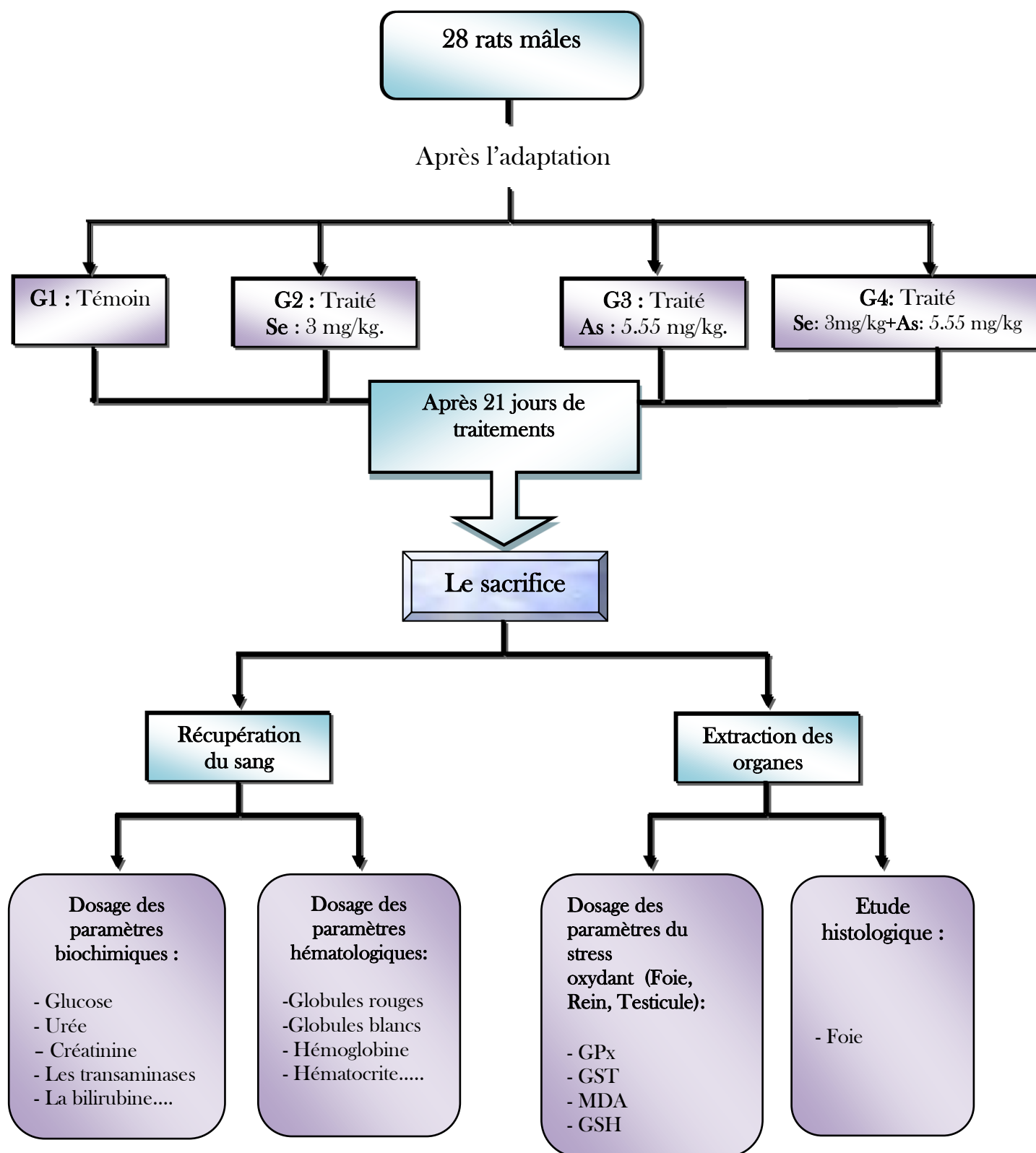
A la fin de période de traitement, que ce soit pour la première ou la deuxième expérimentation, les groupes sont sacrifiés (par décapitation), le sang est immédiatement recueilli dans deux tubes polyéthylènes étiquetés. L'un contient l'anticoagulant EDTA et l'autre étant sec, ce dernier est centrifugé à 3000 tours/min pendant 15 minutes, le sérum obtenu a été stocké au congélateur à - 20°C jusqu'à l'analyse. Alors que les tubes à EDTA sont immédiatement transportés dans une glacière au laboratoire d'analyse pour déterminer la formule de numération sanguine (FNS).

### 5.2. Prélèvement des organes

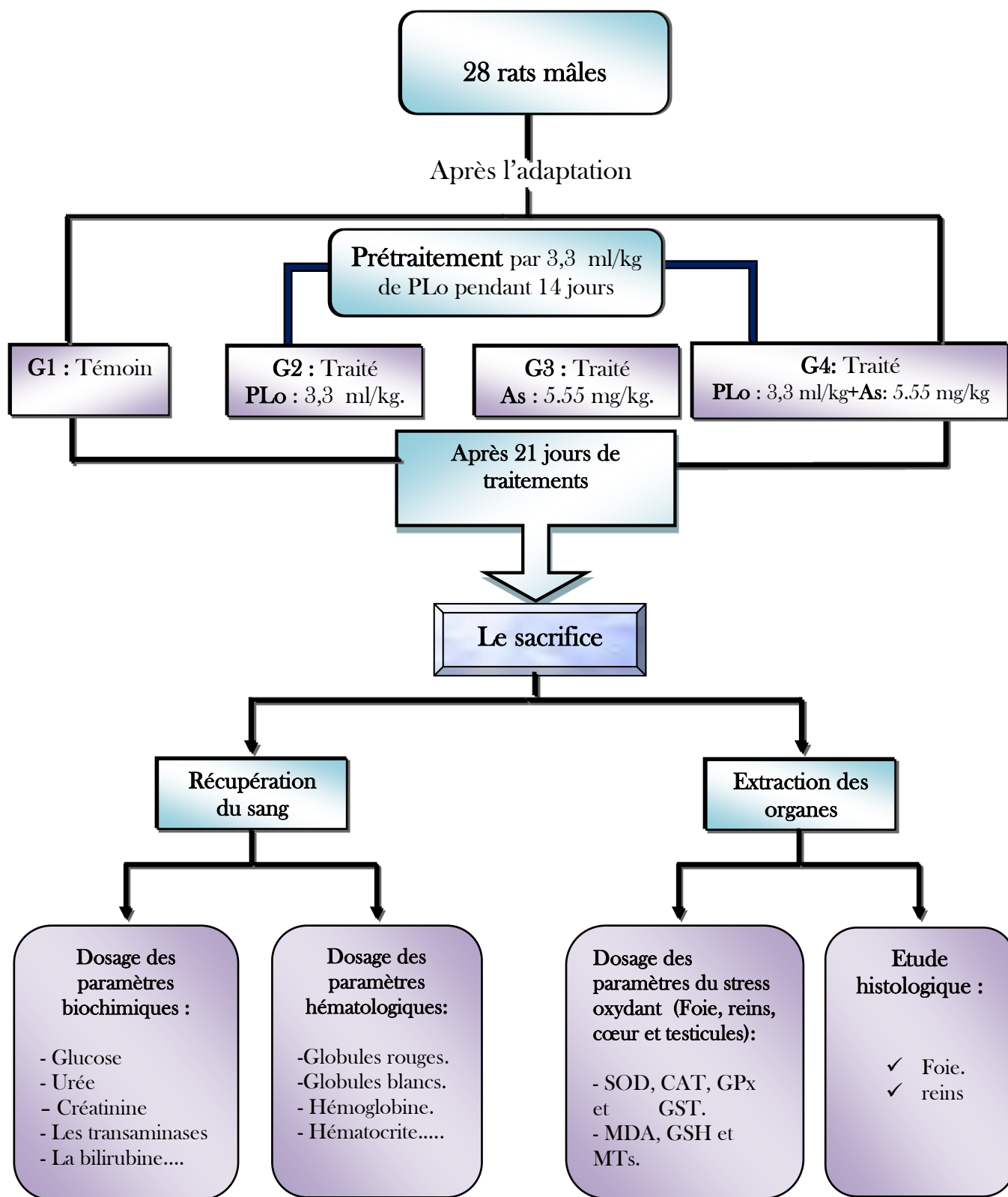
Les animaux sacrifiés ont été ouverts ventralement pour le prélèvement de certains organes :

- Le cœur et les testicules ont été pesés puis stockés au congélateur pour le dosage des paramètres du stress oxydant.
- Le foie et les reins ont été stockés selon deux méthodes : la moitié au congélateur pour le dosage des paramètres du stress oxydant, et l'autre moitié fixée dans le formol afin de réaliser des coupes histologiques.

Les Figures 13 et 14 schématisent les différentes étapes des protocoles réalisés dans les deux expérimentations.



**Figure 13.** Schéma récapitulatif de la première expérimentation



**Figure 14.** Schéma récapitulatif de la deuxième expérimentation.

## 6. Méthodes de dosage des paramètres biochimiques

Le dosage des paramètres biochimiques est réalisé par des kits fournis par Spinreact, Espagne.

### 6.1. Protéine totale

Les liaisons peptidiques réagissent avec les sulfates de cuivre en milieu alcalin formant une coloration violette (bleu-violet) dont l'intensité mesurée à 550 est proportionnelle à la quantité de protéines présentes dans le milieu.

#### Mode opératoire

	Blanc	Etalon	Echantillon
Réactif (ml)	1.0	1.0	1.0
Etalon (µl)	-	25	-
Echantillon (µl)	-	-	25

Mélanger, incuber pendant 5 min à 37<sup>0</sup> C, ou 10 min à une température ambiante. Lire les densités optiques des échantillons et de l'étalon contre le blanc à 550 nm.

La concentration des protéines totales est calculée par la formule suivante :

$$\text{Protéine totale (g/l)} = \frac{\text{DO}_{\text{échantillon}}}{\text{DO}_{\text{étalon}}} \times \text{concentration de l'étalon (70 g/l)}.$$

### 6.2. Dosage d'albumine

L'albumine réagit avec le vert de bromocrésol (BCG), pour former un complexe coloré. Le pH du milieu est maintenu à 4.2 par le tampon. Après l'incubation, l'absorbance du mélange est mesurée à 628 nm.

#### Mode opératoire

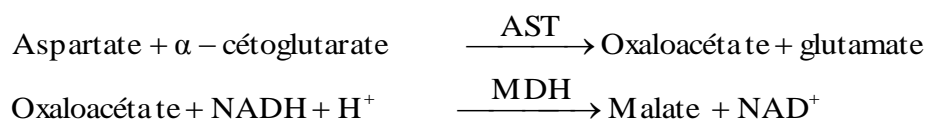
	Blanc	Etalon	Echantillon
Réactif (ml)	1	1	1
Etalon (µl)	-	5	-
Echantillon (µl)	-	-	5

Mélanger, incuber pendant 5 min à 37<sup>0</sup> C. Lire les densités optiques contre le blanc à 628 nm. La concentration d'albumine est calculée par la formule suivante :

$$\text{Albumine (g/l)} = \frac{\text{DO}_{\text{échantillon}}}{\text{DO}_{\text{étalon}}} \times \text{concentration de l'étalon (50 g/l)}$$

### 6.3. Dosage de l'activité catalytique d'aspartate aminotransférase

L'aspartate aminotransférase (AST) appelée aussi l'oxaloacétate de glutamate (GOT) catalyse le transfert réversible d'un groupe aminé à partir de l'aspartate au  $\alpha$ -cétooglutarate formant le glutamate et l'oxaloacétate. L'oxaloacétate est réduit au malate par la malate déshydrogénase (MDH) et le NADH, H<sup>+</sup>.



#### Mode opératoire

Réactif de travail (ml)	1.0
Echantillon (μl)	100

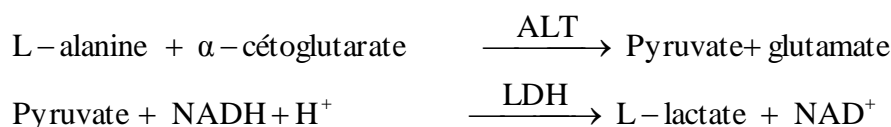
Mélanger, incuber pendant une minute. Lire à 340 l'absorbance initiale et démarrer le chronomètre simultanément. Lire à nouveau après 1, 2 et 3 minutes.

L'activité enzymatique d'ASAT calculée par la formule suivante :

$$\text{ASAT (UI/L)} = \Delta A / \text{min} \times 1750$$

### 6.4. Dosage de l'activité catalytique d'alanine aminotransférase

Le principe est présenté selon la réaction suivante :



La diminution de la concentration en NADH est directement proportionnelle à l'activité enzymatique d'alanine aminotransférase dans l'échantillon.

#### Mode opératoire

Réactif de travail (ml)	1.0
Echantillon (μl)	100

Mélanger, incuber pendant une minute à température ambiante et lire l'absorbance initiale à 340 nm. Lire à nouveau après 1, 2 et 3 minutes. Déterminer la moyenne des absorbances par minutes ( $\Delta \text{Abs} / \text{min}$ ) pour l'utiliser dans les calculs.

La concentration d'alanine aminotransférase est calculée par la formule suivante :

$$\text{ALAT (UI/L)} = \Delta A/\text{min} \times 1750$$

### 6.5. Dosage de l'activité catalytique de la phosphatase alcaline

La phosphatase alcaline catalyse l'hydrolyse de p-nitrophényl phosphate à pH 10.4 pour donner le p-nitrophénol et le phosphate, selon la réaction suivante :



La formation de p-nitrophénol est mesurée photométriquement, où elle est proportionnelle à l'activité catalytique de la phosphatase alcaline dans l'échantillon.

#### Mode opératoire

Réactif de travail (ml)	1.2
Echantillon (µl)	20

Mélanger, incuber pendant une minute. Lire à 405 l'absorbance initiale et démarrer le chronomètre simultanément. Lire à nouveau après 1, 2 et 3 minutes. Déterminer la moyenne des absorbances par minutes ( $\Delta \text{Abs}/\text{min}$ ) pour l'utiliser dans les calculs.

Pour estimer l'activité enzymatique de la PAL, la formule suivante a été utilisée :

$$\text{PAL (UI/L)} = \Delta \text{DO}/\text{min} \times 3300.$$

### 6.6. Dosage de la bilirubine totale

La bilirubine réagit avec l'acide sulfanilique diazoté à pH acide pour produire l'azobilirubine. Cette réaction est instantanée avec la bilirubine directe (la bilirubine conjuguée), par contre avec la bilirubine totale (bilirubine non conjuguée) elle nécessite la solubilisation par le diméthylsulfoxyde (DMSO). L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration de la bilirubine dans l'échantillon.

#### Mode opératoire

	Blanc	BL totale
Réactif 1 : BL totale (ml)	1.5	1.5
Réactif 2 : (µl)	-	50
Echantillon/calibrant (µl)	100	100

Mélanger et lire la densité optique après 5 minutes d'incubation à une longueur d'onde 555 nm.

La concentration de la bilirubine est calculée par la formule suivante :

$$\text{Bilirubine totale (mg/dl)} = \frac{\text{DO}_{\text{échantillon}} - \Delta \text{DO}_{\text{blanc échantillon}}}{\text{DO}_{\text{étalon calibrant}} - \text{DO}_{\text{blanc calibrant}}} \times \text{concentration de calibrant}$$

### 6.7. Dosage de la créatinine

L'essai est basé sur la réaction de la créatinine avec acide picrique : c'est la réaction de JAFFE. La créatinine réagit avec le picrate alcalin pour donner un complexe coloré, mesuré dans un intervalle de temps défini et proportionnel à la concentration en créatinine de l'échantillon.

#### Mode opératoire

	Blanc	Etalon	Echantillon
<b>Réactif de travail (ml)</b>	1.0	1.0	1.0
<b>Etalon (µl)</b>	-	100	-
<b>Echantillon (µl)</b>	-	-	100

Mélanger, déclencher le chronomètre. Lire à 492 nm la densité optique (DO1) après 30 secondes et la densité optique (DO2) après 90 secondes.

La concentration de la créatinine est calculée selon la formule suivante :

$$\text{Créatinine (mg/dl)} = \frac{\Delta \text{DO}_{\text{échantillon}} - \Delta \text{DO}_{\text{blanc}}}{\Delta \text{DO}_{\text{étalon}} - \Delta \text{DO}_{\text{blanc}}} \times \text{concentration de l'étalon (2 mg/dl)}$$

$$\Delta \text{DO} = (\text{DO 2} - \text{DO 1})$$

### 6.8. Dosage de l'urée

L'uréase hydrolyse l'urée en ammoniacque (NH<sub>3</sub>) et le dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>). L'ion ammonium réagit avec l'alpha-cétoglutarate en présence de la glutamate déshydrogénase et du système NADH/NAD<sup>+</sup> servant l'indicateur, où la diminution de l'absorbance à 340 nm due à la transformation du NADH en NAD<sup>+</sup>, cette diminution est directement proportionnelle à la concentration de l'urée dans l'échantillon (Kaplan, 1984), selon les réactions ci-dessous :



### Mode opératoire

	Blanc	Etalon	Echantillon
Réactif de travail (ml)	1.0	1.0	1.0
Etalon (µl)	-	10	-
Echantillon (µl)	-	-	10

Mélanger, Lire les densités optiques de l'échantillon et de l'étalon après 30 secondes (DO1) et après 90 secondes (DO2) à 340 nm.

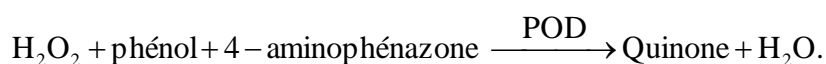
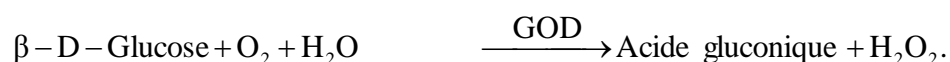
La concentration de l'urée est calculée par la formule suivante :

$$\text{Urée (mg/dl)} = \frac{\Delta \text{DO}_{\text{échantillon}}}{\Delta \text{DO}_{\text{étalon}}} \times \text{concentration de l'étalon (50 mg/dl)}$$

$$\Delta \text{DO} = (\text{DO 2} - \text{DO 1})$$

### 6.9. Dosage du glucose

Le glucose est transformé par la glucose oxydase (GOD) en acide gluconique et peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Ce dernier, en présence de peroxydase (POD), oxyde le chromogène incolore (4-aminophénazone) en un composé coloré en rouge-violet (quinoneimine) selon les réactions suivantes :



### Mode opératoire

	Blanc	Etalon	Echantillon
Réactif de travail (ml)	1.0	1.0	1.0
Etalon (µl)	-	10	-
Echantillon (µl)	-	-	10



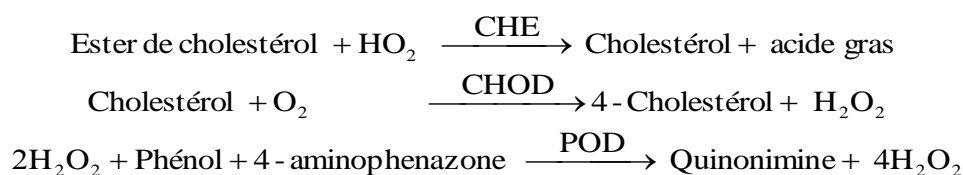
Mélanger, incuber pendant 10 min à 37<sup>0</sup> C, ou 15-20 min à une température ambiante. Lire les absorbances des échantillons et de l'étalon contre le blanc réactif à 505 nm. La coloration finale est stable au moins 30 minutes.

La concentration du glucose est calculée par la formule suivante :

$$\text{Glucose (mg/dl)} = \frac{\text{DO}_{\text{échantillon}}}{\text{DO}_{\text{étalon}}} \times \text{concentration de l'étalon (100 mg/dl)}.$$

### 6.10. Dosage de cholestérol total

Le cholestérol présent dans les échantillons est déterminé selon les réactions suivant :



L'intensité de la couleur formé est proportionnelle à la concentration de cholestérol dans l'échantillon.

#### Mode opératoire

	Blanc	Etalon	Echantillon
<b>Réactif de travail (ml)</b>	1	1	1
<b>Etalon (µl)</b>	–	10	–
<b>Echantillon (µl)</b>	–	–	10

Mélanger, incuber pendant 5 min à 37°C ou 10 min à une température ambiante. Lire les densités optiques des échantillons et de l'étalon contre le blanc à 505 nm.

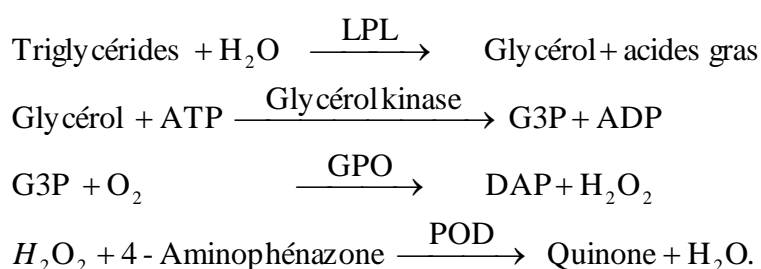
La concentration de cholestérol est calculée par la formule suivant :

$$\text{Cholestérol (mg/dl)} = \frac{\text{DO}_{\text{échantillon}}}{\text{DO}_{\text{étalon}}} \times \text{concentration de l'étalon (200 mg/dl)}.$$

### 6.11. Dosage de triglycérides

L'hydrolyse des triglycérides par la lipoprotéine lipase libère le glycérol plus des acides gras. Le glycérol est converti en présence de la glycérol kinase et ATP en glycérol-3-phosphate (G3P) et adénosine-5-diphosphate (ADP). Glycérol-3-phosphate (G3P) est converti en dihydroxy acétone phosphate (DAP) et peroxyde d'hydrogène

par la glycérol phosphate déhydrogénase (GPO). Le peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$  réagit avec le 4-aminophénazone (4-AD) et p-chlorophénol en présence de peroxydase (POD), pour donner un complexe coloré:



### Mode opératoire

	Blanc	Etalon	Echantillon
Réactif de travail (ml)	1	1	1
Etalon (μl)	—	10	—
Echantillon (μl)	—	—	10

Mélanger, incuber pendant 5 min à 37°C ou 10 min à une température ambiante. Lire les densités optiques des échantillons et de l'étalon contre le blanc à 505 nm.

La concentration des triglycérides est calculée par la formule suivant :

$$\text{Triglycérides (mg/dl)} = \frac{DO_{\text{échantillon}}}{DO_{\text{étalon}}} \times \text{concentration de l'étalon (200 mg/dl)}.$$

## 7. Dosage des paramètres du stress oxydant

### 7.1. Préparation de l'homogénat

Un gramme de chaque tissu (foie, reins, testicules ou cœur) est homogénéisé dans le TBS (Tris 50 mM, NaCl 150m M, pH 7.4). Après homogénéisation des tissus on a procédé à une centrifugation de la suspension cellulaire (9000 tours/min, - 4°C, 15 min), puis les surnageants obtenus sont aliquotés dans des tubes eppendorfs puis conservés à - 20°C en attendant d'effectuer les dosages des paramètres du stress oxydatif.

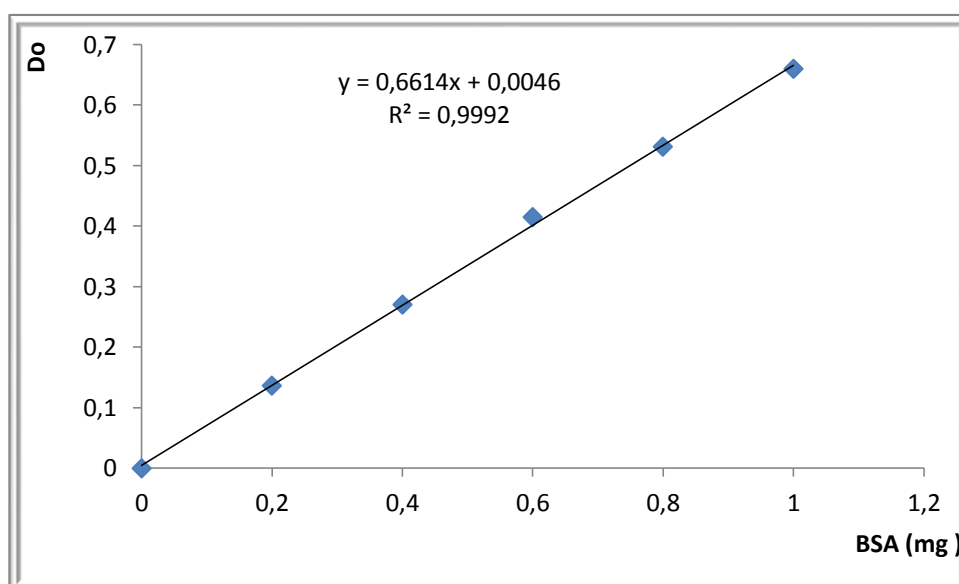
## 7.2. Dosage des protéines

La concentration de protéines est déterminée selon la méthode de Bradford (1976) qui utilise le bleu de Coomassie comme réactif. Ce dernier réagit avec les groupements amines ( $-NH_2$ ) des protéines pour former un complexe de couleur bleu. (L'apparition de la couleur bleue reflète le degré d'ionisation du milieu acide et l'intensité correspond à la concentration des protéines).

Pour cela, nous avons procédé aux étapes suivantes :

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

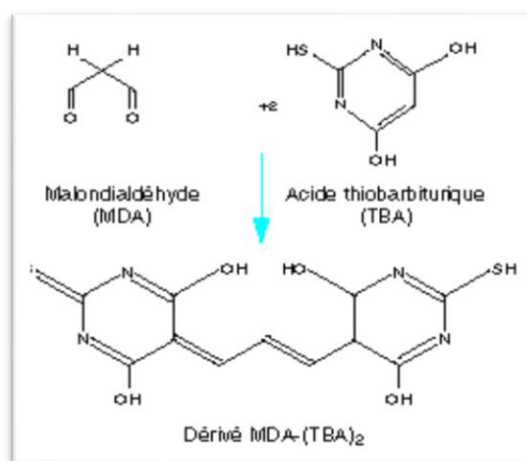
La concentration des protéines est déterminée par comparaison à une gamme étalon d'albumine sérique bovine (1mg/ml) préalablement réalisée dans les mêmes conditions (voir fig.15).



**Figure 15** : Gamme d'étalonnage utilisée (BSA 1mg/ml) pour le dosage des protéines.

### 7.3. Dosage de malondialdéhyde

Le dosage de malondialdéhyde (MDA) est réalisé selon la méthode d'Esterbauer et al. (1992). Le principe de ce dosage est basé sur la condensation de MDA en milieu acide et à chaud avec l'acide thiobarbiturique (Fig. 16), pour former un pigment (rose). Ce chromogène peut être donc mesuré par spectrophotométrie d'absorption à 530 nm.



**Figure 16.** Réaction du dialdéhyde malonique avec l'acide thiobarbiturique.

La procédure expérimentale du dosage, est la suivante :

- ✓ Prélever 375 µl de l'homogénat (surnageant) ;
- ✓ Ajouter 150 µl de la solution tampon TBS (Tris 50 mM, NaCl 150 mM pH 7.4) ;
- ✓ Ajouter 375 µl de la solution TCA-BHT (TCA 20%, BHT 1%) ;
- ✓ Vortexer et Centrifuger à 1000 tours/min pendant 10 min ;
- ✓ Prélever 400 µl du surnageant ;
- ✓ Ajouter 80 µl du HCl 0.6 M ;
- ✓ Ajouter 320 µl de la solution Tris-TBA (Tris 26 mM, TBA 120mM) ;
- ✓ Mélanger et incuber au bain marie à une température de 80°C pendant 10 minutes.

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

lipides peroxydés. La concentration de MDA est calculée selon la formule suivante :

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

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

#### 7.4. Dosage du glutathion

Le dosage du glutathion (GSH) est réalisé selon la méthode de Weekbeker et Cory (1988). Le principe de ce dosage repose sur la mesure de l'absorbance optique de l'acide 2-nitro-5-mercapturique qui résulte de la réduction de l'acide 5,5 dithio-bis-2-nitrobenzoïque (DTNB) par les groupements (-SH) du glutathion. Pour cela on réalise une déprotéinisation afin de garder uniquement les groupements (-SH) spécifique du glutathion.

La procédure expérimentale du dosage de glutathion est la suivante :

- ✓ Prélever 0.8 ml de l'homogénat ;
- ✓ 0.2 ml de la solution d'acide salicylique (0.25%) ;
- ✓ Agiter et laisser pendant 15 minutes dans un bain de glace ;
- ✓ Centrifuger à 1000 tours/min pendant 5 min ;
- ✓ Prélever 0.5 ml du surnageant ;
- ✓ Ajouter 1 ml du tampon Tris- EDTA, pH 9.6 ;
- ✓ Mélanger et ajouter 0.025 ml de l'acide 5,5 dithio-bis-2-nitrobenzoïque (DTNB) à 0.01 M.

Laisser pendant 5 min à une température ambiante et lire les densités optiques à 412 nm contre le blanc réactif.

La concentration du glutathion est obtenue par la formule suivante :

$$\text{GSH (nmol GSH/ mg protéine)} = \frac{DO \times 1 \times 1,525}{13100 \times 0,8 \times 0,5 \times \text{mg protéine}}$$

- DO : Densité optique.
- 1 : Volume total des solutions utilisées dans la déprotéinisation (0.8ml homogénat + 0.2 ml de l'acide salicylique).
- 1.525 : Volume total des solutions utilisées dans le dosage du GSH au niveau du surnageant (0.5 ml surnageant+1 ml Tris + 0.025 ml DTNB).
- 13100 : Coefficient d'absorbance du groupement -SH à 412 nm.
- 0.8 : Volume de l'homogénat.
- 0.5 : Volume du surnageant.

### 7.5. Dosage des métallothionéines

Les métallothionéines (MTs) sont mesurés selon la méthode de Viarengo et al. (1997) modifiée par Petrovic et al. (2001). La technique consiste à évaluer le nombre des groupements SH en utilisant le GSH comme une référence.

L'extraction tissulaire a été préparé de la façon suivante, 1 g de chaque organe (Foie, reins et cœur) est homogénéisé en présence de 3 ml de tampon d'homogénéisation (20 mM Tris-HCl, 0,01%  $\beta$  mercaptoéthanol pH 8,6), puis centrifugé à 30.000 g pendant 20 minutes à froid pour récupérer le surnageant.

Dans des tubes eppendorfs, on introduit dans l'ordre :

- ✓ 0.5 ml de cytosol (surnageant) ;
- ✓ 0.525 ml d'éthanol absolu maintenu à - 20 °C ;
- ✓ 40  $\mu$ l de chloroforme maintenu à - 20 °C ;

On agite au vortex puis on centrifuge à 6000 g pendant 10 minutes à - 4 °C. Ensuite on récupère le surnageant et on lui ajoute dans l'ordre :

- ✓ 20  $\mu$ l HCl 37 % ;
- ✓ 50  $\mu$ l ARN (1 mg/ ml) ;
- ✓ 2910  $\mu$ l éthanol à - 20 °C ;

On garde les tubes 1 h à - 20°C puis on centrifuge à 6000 g pendant 10 minutes à - 4°C. On jette le surnageant et on lave le culot avec 1 ml de la solution de lavage (87% éthanol à - 20 °C, 1% chloroforme et 12% tampon d'homogénéisation). On centrifuge à 6000 g pendant 10 minutes à froid, on jette le surnageant et on sèche le culot à l'air libre.

On dissout le culot dans 150  $\mu$ l NaCl 0.25 M, on agite au vortex et on ajoute 150  $\mu$ l EDTA/HCl (1N HCl, 4 mM EDTA).

On agite au vortex jusqu'à la dissolution complète, puis on ajoute 4.2 ml de DTNB (0.43 mM) dans chaque tube, ensuite on centrifuge à 3000 g pendant 5 minutes.

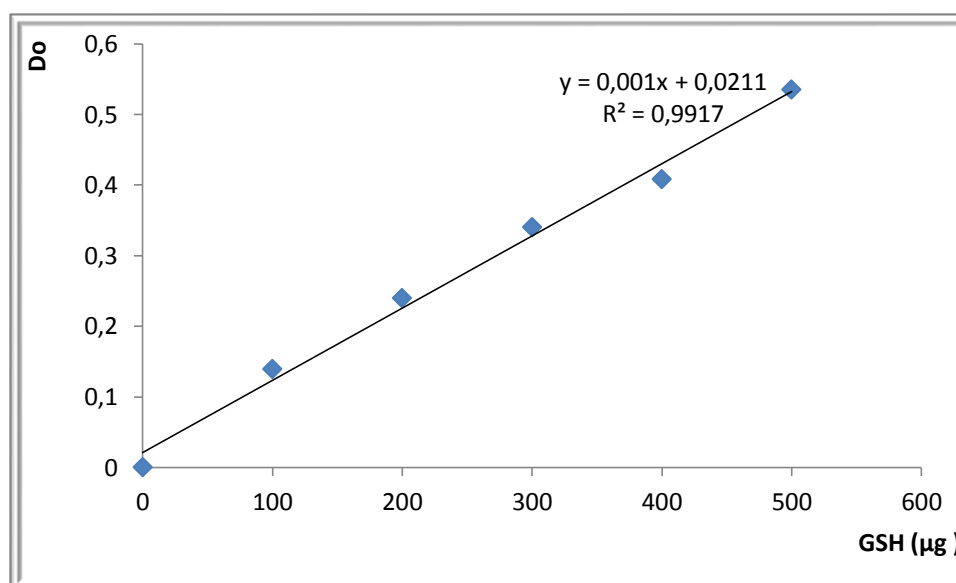
Lire les densités optiques des échantillons à 412 nm.

Une gamme d'étalon de 0 à 500  $\mu$ g de GSH est réalisée. Elle servira au traçage de la courbe d'étalonnage et à la détermination de la masse de GSH et par la suite on peut déterminer la concentration des métallothionéines exprimée en  $\mu$ g/g d'organe, selon la formule suivante :

$$C(MTs) = \frac{GSH (\mu g) \times 8600}{307,3 \times 21 \times pf(g)}$$

- 8600 : masse molaire de MTs.
- 307,3 : masse molaire de GSH.
- Pf : poids frais de l'organe.
- 21 : nombre de groupements SH par molécule de MTs.

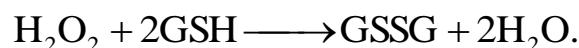
Les teneurs en MTs sont quantifiées en utilisant une gamme étalon de 0 à 500  $\mu$ g de GSH (Fig. 17).



**Figure 17.** Courbe standard de GSH exprimé en  $\mu$ g pour le dosage des métallothionéines.

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

L'activité enzymatique de la GPx a été mesurée par la méthode de Flohe et Gunzler (1984). Cette méthode est basée sur la réduction de peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) en présence de glutathion réduit (GSH), ce dernier est transformé en (GSSG) sous l'influence de la GPx selon la réaction suivante :



Pour cela que, nous avons procédé aux étapes suivantes :

- ✓ Prélever 0,2 ml de l'homogénat (surnageant) ;
- ✓ Ajouter 0,4 ml de GSH (0,1 mM) ;
- ✓ Ajouter 0,2 ml de la solution tampon TBS (Tris 50 mM, NaCl 150 mM pH 7.4 ;
- ✓ Incuber au bain marie à 25°C, pendant 5 min ;
- ✓ Ajouter 0,2ml de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (1,3 mM) pour initier la réaction, laisser agir pendant 10 minutes ;
- ✓ Ajouter 1 ml de TCA (1%) pour arrêter la réaction ;
- ✓ Mettre le mélange dans la glace pendant 30 minutes ;
- ✓ Centrifuger durant 10 minutes à 3000 tours /minutes ;
- ✓ Prélever 0,48 ml du surnageant ;
- ✓ Ajouter 2,2 ml de la solution tampon TBS ;
- ✓ Ajouter 0,32 ml de DTNB (1,0 mM) ;
- ✓ Mélanger et après 5 minutes lire les densités optiques à 412 nm ;

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

$$\text{GPx } (\mu\text{mol GSH/mg protéine}) = \frac{(\text{DO Echantillon} - \text{DO Etalon}) \times 0,04}{\text{DO Etalon}} \times \frac{5}{\text{mg protéine}}$$

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



### 7.7. Dosage de l'activité de glutathion-s-transférase (GSTs)

La mesure de l'activité des GST, consiste à fournir à l'enzyme un substrat en général le 1-chloro, 2,4-dinitrobenzène (CDNB), qui réagit facilement aux nombreuses formes de GST et du glutathion. La réaction de conjugaison de ces deux produits entraîne la formation d'une nouvelle molécule qui absorbe la lumière à 340 nm.

La méthode utilisée dans cette étude pour doser les GSTs est celle de Habig et al. (1974) ; celle-ci consiste à faire agir les GSTs contenues dans l'homogénat sur un mélange (GSH + CDNB) à une température de 37°C et à un pH de 6,5. La variation de la densité optique, due à l'apparition du complexe GSH-CDNB, est mesurée pendant 1 minute durant 5 minutes à une longueur d'onde de 340 nm.

Réactifs	Blanc (µl)	Essai (µl)
▪ Tampon phosphate (0.1M) pH 6.5	850	830
▪ CDNB (0.02M)	50	50
▪ GSH (0.1M)	100	100
▪ Homogénat	-	20

La valeur de la densité optique du blanc (conjugaison spontanée du substrat) a été ensuite retranchée à la valeur de chaque essai afin de mesurer la variation due uniquement à l'activité de l'enzyme.

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

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

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

### 7.8. Dosage de l'activité enzymatique de la catalase (CAT)

La CAT est dosée selon la méthode d'Aebi (1984). La mesure de l'activité catalytique à 240 nm est basée sur la variation de la densité optique consécutive à la dismutation d' $\text{H}_2\text{O}_2$  selon la réaction suivante :



Les absorbances sont lus après 15 secondes de délai et durant 60 secondes de mesure.

Réactifs	Zéro (µl)	Blanc (µl)	Essai (µl)
▪ Tampon phosphate (100 mM) pH 7.4	1000	800	780
▪ $\text{H}_2\text{O}_2$ (500 mM)	-	200	200
▪ surnageant	-	-	20

L'activité catalytique est calculée selon l'équation suivante :

$$\text{Activité CAT (}\mu\text{moles d'}\text{H}_2\text{O}_2 \text{ / min / mg de protéine)} = \frac{\Delta\text{DO}}{\varepsilon \times l \times X \times \text{Fd}}. \text{ Avec :}$$

- ✓  $\Delta\text{DO}$  : Variation de la densité optique par minutes.
- ✓  $\varepsilon$  : Coefficient d'extinction d' $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $0,043 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ).
- ✓  $l$  : Largeur de la cuve.
- ✓  $X$  : Quantité de protéines en mg/ml.
- ✓  $\text{Fd}$  : Facteur de dilution pour le  $\text{H}_2\text{O}_2$  dans la solution tampon

### 7.9. Dosage de l'activité enzymatique de la superoxyde dismutase (SOD)

La méthode de dosage de l'activité SOD par le test NBT est basée sur la photoréduction du complexe riboflavine/méthionine qui génère des anions superoxydes. L'oxydation du NBT par l' $\text{O}_2 \bullet^-$  est utilisée comme base de détection de la présence de SOD. Dans un milieu aérobie ; le mélange riboflavine, méthionine et NBT donne une coloration bleuâtre. La présence de SOD inhibe l'oxydation du NBT (Byer et Fridovich, 1987). Dans un milieu réactionnel d'EDTA (0,1 mM), Met (13 mM), tampon phosphate (50 mM, pH 7,8), NBT (75  $\mu\text{M}$ ) et riboflavine (2  $\mu\text{M}$ ) ; les absorbances des échantillons sont mesurées à 560 nm après une calibration obtenue par le blanc.

Réactifs	Blanc (µl)	Essai (µl)
EDTA-Met (0,1 mM, 13 mM)	1000	1000
Tampon phosphate (50 mM) pH 7,8	1000	1000
Echantillon	-	50
Tampon phosphate	1000	950
NBT (75 µM)	85,2	85,2
Riboflavine (2 µM)	22,6	22,6

L'activité SOD = % d'inhibition / mg de protéine.

$$Y = \left( \left[ \frac{DO\ B - DO\ E}{DO\ B} \times 100 \right] \frac{20}{\text{mg protéine/ml}} \right) \times \text{facteur de dilution}$$

50 µl d'échantillon prélevé  $\xrightarrow{\times 20}$  1000 µl

Une unité SOD correspond à la quantité de protéines qui induit 50% d'inhibition.

$Y \rightarrow 1\ \text{mg de protéine}$

$50 \rightarrow 50/Y\ \text{mg de protéine}$

Y c'est le pourcentage d'inhibition/ mg de protéine

$50/Y\ \text{mg de protéines} \rightarrow$  Correspond à une unité de SOD.

$1\ \text{mg de protéines} \rightarrow$  Correspond à  $:\frac{1 \times 1}{50/Y} = Y/50$  unité de SOD/mg de protéine.

Donc : Activité spécifique SOD =  $Y/50$  unité de SOD/mg de protéine

## 8. Etude histologique

Les coupes histologiques ont été réalisées à l'hôpital d'Ibn Roched d'Annaba, Service de l'Anatomie Pathologique. La technique utilisée est celle décrite par (Houlod, 1984) qui comporte les étapes suivantes :

➤ **Fixation** : La fixation des échantillons a été faite dans formol

Les prélèvements réalisés sont alors mis dans des cassettes spéciales à parois tournées afin de permettre le passage des liquides.

➤ **Déshydratation des échantillons**

Au début, il faut déshydrater les échantillons à l'aide d'un appareil automatique qui permet le passage automatiques et progressif des échantillons dans des bains d'éthanol de concentration croissante (70, 95 et 100%).

➤ **L'inclusion et réalisation des blocs**

Les pièces sont alors plongées dans des bains de paraffine liquide.

Les tissus étant maintenu et imbibés de paraffine, viennent alors l'étape de l'enrobage qui consiste à inclure le tissu imprégné dans un bloc de paraffine qui, en se solidifiant, va permettre sa coupe. Cette opération fait appel à des appareils « dits à inclusion » refermant un réservoir de paraffine maintenue à l'état liquide par un système de chauffage, un petit robinet et une plaque métallique réfrigérée pour obtenir la solidification rapide du bloc de paraffine contenant le tissu.

La réalisation des coupes minces de quelques microns (5  $\mu$ m en moyenne) est possible grâce à des appareils spéciaux appelés « Microtomes ».

Ces coupes sont étalées sur des lames porte-objet, dépliées et fixées sur la lame par l'utilisation d'une eau gélatineuse chauffée.

➤ **La coloration**

Pour la coloration, on a utilisé la technique à l'Hématoxyline-Eosine ou (Hématéine-Eosine) ; qui nécessite la présence de l'alcool acide (100 ml d'alcool éthylique à 70% + 50 ml d'acide HCl), eau ammoniacale (100 ml d'eau distillée + 2 ml Ammoniaque) et solution d'Eosine (100 ml Eosine solution aqueuse à 3%, 125 ml alcool éthylique à 95%, 375 ml d'eau distillée et 2 gouttes d'acide acétique). La coloration suit les étapes suivantes :

- ✓ déparaffiner et hydrater les lames à l'eau du robinet puis rincer à l'eau distillée.
- ✓ immerger dans un bain d'Hématoxyline de Harris (15 minutes) qui colore en bleu violacée les structures basophiles (noyaux).

- ✓ différencier les coupes dans l'alcool acide (1 à 2 plongées) ; déposer ensuite les lames dans un bain d'eau du robinet et vérifier la différenciation au microscope.
- ✓ bleuir dans un bain d'eau ammoniacale.
- ✓ immerger dans un bain d'Eosine (15 secondes à 2 minutes) qui colore en rose les structures acidophiles (cytoplasme). Tous ces bains sont séparés par des lavages à l'eau du robinet.

Les préparations ensuite ont été séchées puis observées au microscope optique et photographiées à l'aide d'un appareil photo.

## 9. Traitement statistique des résultats

Les résultats ont été représentés sous forme de moyenne plus ou moins ( $\text{Moy} \pm \text{SEM}$ ) l'écart type moyen, la comparaison entre les différents groupes est effectuée après une analyse de la variance (ANOVA), les moyennes sont comparées par un test t de Student.

L'analyse statistique des données a été réalisée grâce au logiciel MINITAB (Version 13.31).

Les différences sont considérées comme :

- Significatives lorsque ( $P \leq 0,05$ ).
- Hautement significative comparant au témoin ( $P \leq 0,01$ ).
- Très hautement significative comparant au témoin ( $P \leq 0,001$ ).

---

## CHAPITRE II : RÉSULTATS DE LA PREMIÈRE EXPÉRIMENTATION

---



## II. Résultats de la première expérimentation

### 1. Etude pondérale

#### 1.1. Action sur la croissance corporelle

Nos résultats montrent une diminution significative ( $P \leq 0,05$ ) de poids corporel et une baisse du gain de poids chez le lot traité par l'arsénite de sodium (- 12,60%) par rapport au groupe témoin, tandis que, on n'enregistre aucune différence significative du poids corporel chez les lots traités par le sélénite de sodium et par la combinaison ; sélénite de sodium /arsénite de sodium comparant aux rats témoins (voir tab. 7, fig. 18).

#### 1.2. Action sur le poids relatif de certains organes

Nous avons suivi la variation des poids absolu (PA) et relatif (PR) des organes suivants ; le foie, les reins et les testicules chez les rats témoins et les rats recevant le sélénium, l'arsenic ou l'arsenic/sélénium.

Les résultats obtenus montrent qu'il y a une augmentation très hautement significative ( $P \leq 0,001$ ) de poids relatif de foie et une augmentation significative ( $P \leq 0,05$ ) de poids relatif des reins chez le groupe traité par l'arsénite de sodium comparant au groupe témoin, par contre chez le groupe traité par la combinaison l'arsenic/sélénium on note une augmentation significative ( $P \leq 0,05$ ) de poids relatif de foie et aucune variation significative de poids relatif des reins comparant au groupe témoin. Concernant le poids relatif des testicules, l'analyse statistique ne montre aucune variation statistiquement significative chez tous les groupes traités (tab. 7 ; fig. 19).

**Tableau 7.** Variation de poids corporel PC (g) et de poids relatif PR (g/100 g de poids corporel) des organes (Foie, reins et testicules) chez les rats témoins et traités par le sélénite de sodium, l'arsénite de sodium et à la combinaison (l'arsénite de sodium/sélénite de sodium).

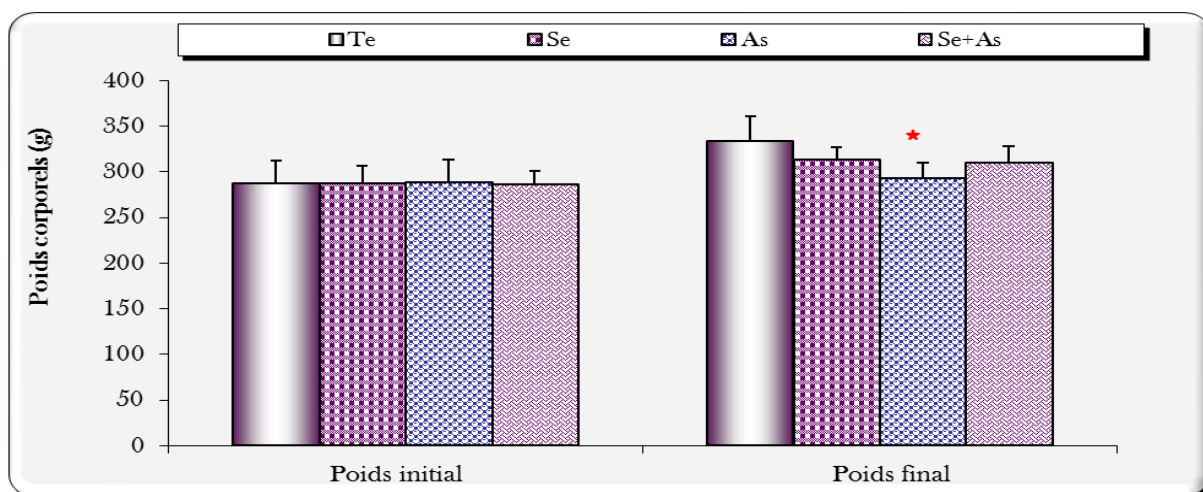
Paramètres	Lots expérimentaux			
	Témoin	Sélénium	Arsenic	Arsenic/Sélénium
Poids initial (g)	287,14 ± 25,31	287,5±18,77	287,85 ± 25,30	286,42± 14,89
Poids final (g)	334,29 ± 26,53	312,5± 14,69	292,14 ±18,16*	309,28 ± 19,38
%	-	-6,51 %	-12,6 %	-7,48 %
Gain de poids (g)	+ 47,15	+25	+4,29	+22,86
Poids relatif du foie	2,79 ± 0,13	2,91 ± 0,12	3,59 ± 0,38***	3,09 ± 0,20*, #
%	-	+4,30%	+ 28,67%	+10,89%
Poids relatif des reins	0,58 ± 0,03	0,60 ± 0,03	0,71 ± 0,08*	0,60 ± 0,01#
%	-	+3,44 %	+22,41 %	+3,44%
Poids relatif des testicules	0,92 ± 0,14	1,03 ± 0,04	1,04 ± 0,09	1,05 ± 0,09
%	-	+11,95%	+13,04%	+14,13%

Différence significative comparant au groupe témoin : \*P ≤ 0,05 ; \*\*\*P ≤ 0,001.

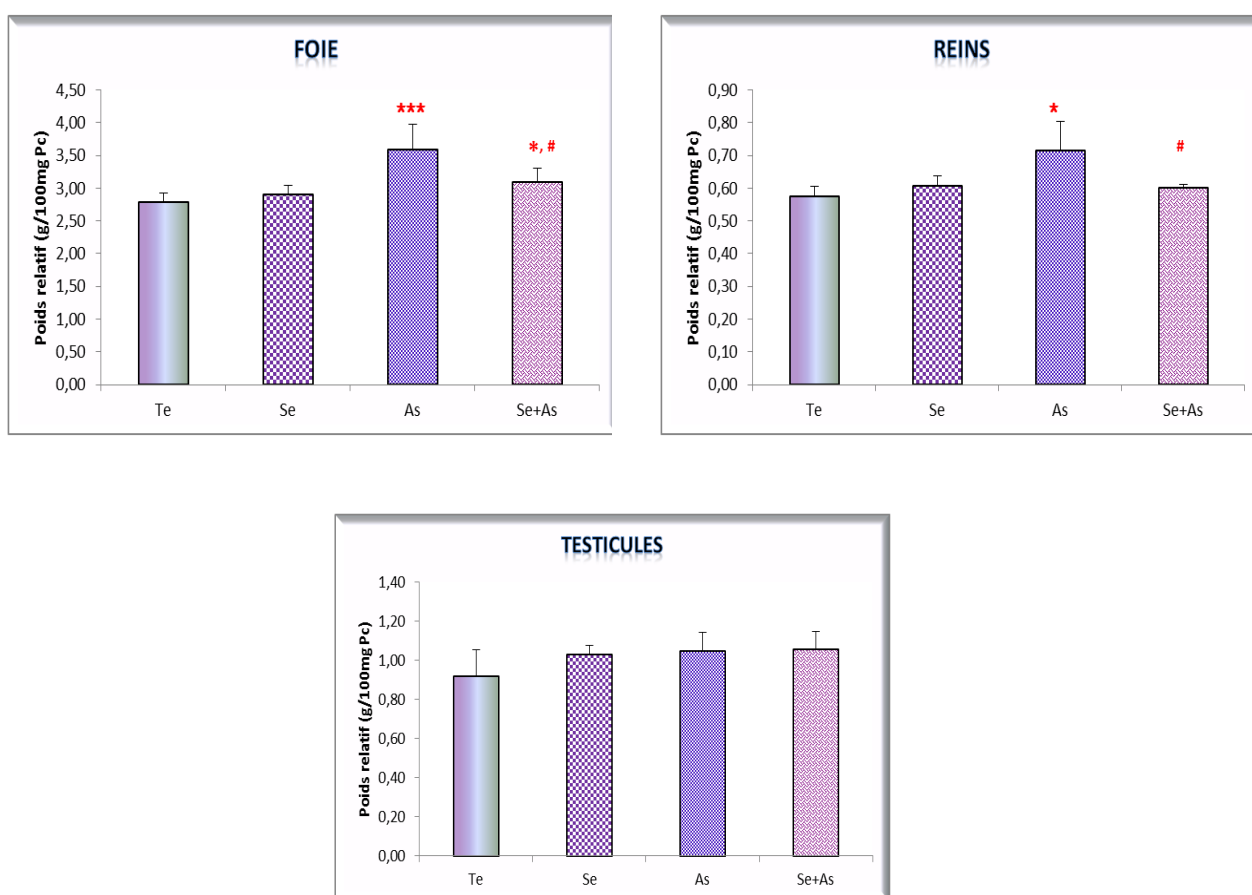
Différence significative comparant au groupe traité par l'arsenic : #P ≤ 0,05; ##p ≤ 0.01.

P : Seuil de signification.





**Figure 18.** Variation de poids corporel en (g) des rats témoins et traités par le sélénite de sodium, l'arsénite de sodium et à la combinaison (l'arsénite de sodium/sélénite de sodium) après 21 jours de traitement.



**Figure 19.** Variation du poids relatif de certains organes (Foie, reins et testicules) en g/100 g Pc chez les rats témoins et traités par le sélénite de sodium, l'arsénite de sodium et à la combinaison (l'arsénite de sodium/sélénite de sodium) après 21 jours de traitement.

## 2. Etude de quelques paramètres hématologiques

Le tableau 8 résume quelques paramètres hématologiques des rats témoins et traités après 21 jours de traitement.

Nos résultats révèlent que le traitement par l'arsénite de sodium provoque une diminution hautement significative ( $P \leq 0,01$ ) des globules rouges (- 18,53%) et d'hémoglobine (- 18,86%) et une diminution très hautement significative ( $P \leq 0,001$ ) d'hématocrite (- 20,96%) et significative ( $P \leq 0,05$ ) du volume globulaire moyen (- 4%) comparant au groupe témoin, par ailleurs on note, une diminution significative ( $P \leq 0,05$ ) des globules rouges, d'hémoglobine, d'hématocrite et aucune différence significative de volume globulaire moyen chez les rats traités par le mélange sélénium/arsenic comparant au lot témoin.

De plus, les analyses statistiques montrent qu'il n'y a pas eu de variations significatives de CCMH et TGMH chez tous les groupes traités comparativement aux témoins (Voir tab. 8 ; fig. 20).

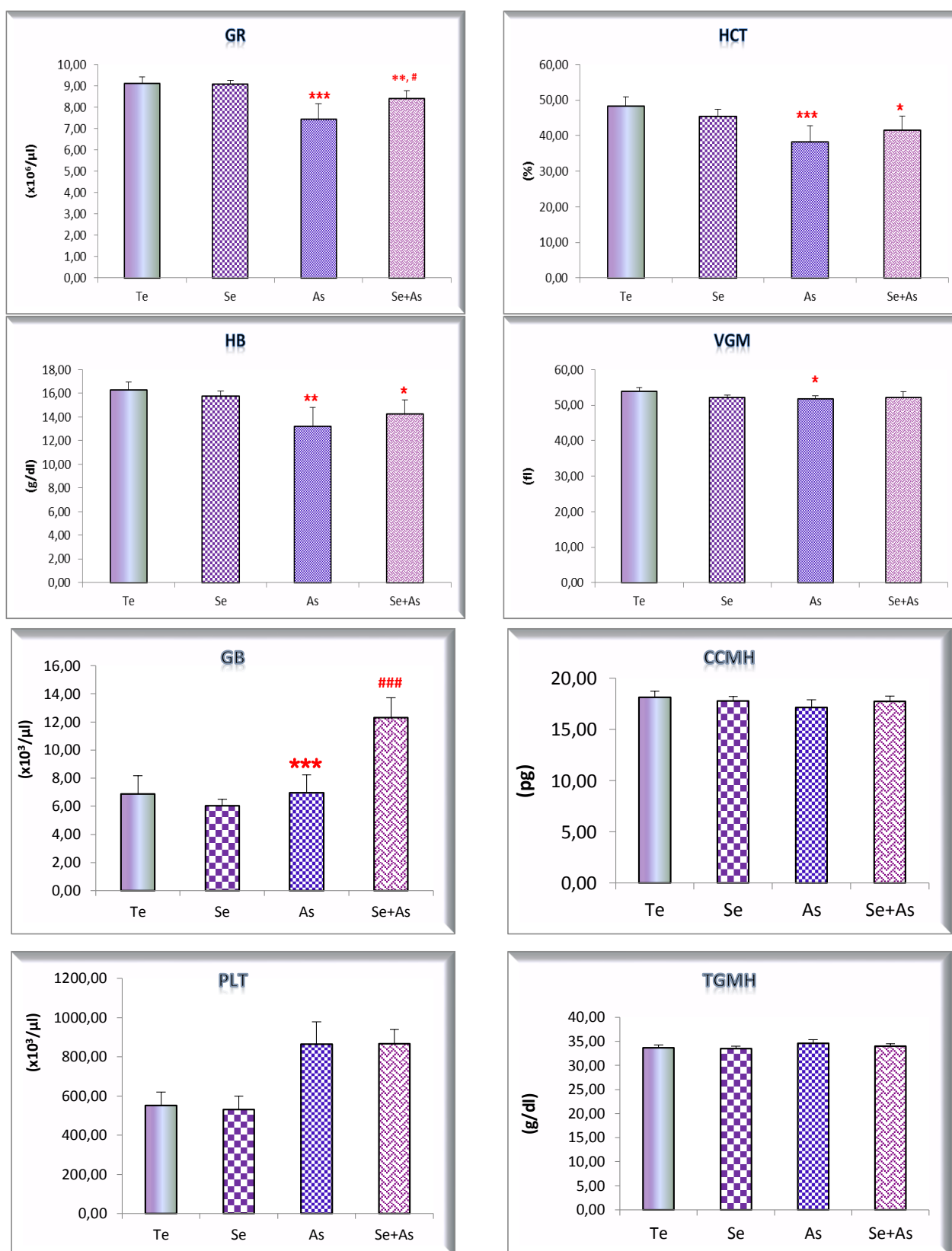
**Tableau 8.** Variation de quelques paramètres hématologiques chez les rats témoins et les traités ; par le sélénite de sodium, l'arsénite de sodium et à la combinaison (l'arsénite de sodium/sélénite de sodium) après 21 jours de traitement.

Paramètres	Les lots expérimentaux			
	Témoin	Sélénium	Arsenic	Arsenic/ Sélénium
<b>Globules blancs (x10<sup>3</sup>/µl)</b>	6,87 ± 1,31	6,05 ± 0,45	6,95 ± 1,28	12,29 ± 1,42 <sup>***,###</sup>
%	—	- 11,93%	+ 1,16%	+ 78,89%
<b>Globules rouges (x10<sup>6</sup>/µl)</b>	9,12 ± 0,29	9,08 ± 0,15	7,43 ± 0,71 <sup>**</sup>	8,41 ± 0,34 <sup>*,#</sup>
%	—	- 0,43%	- 18,53%	- 7,78%
<b>Taux d'hémoglobine (g/dl)</b>	16,27 ± 0,71	15,74±0,44	13,2 ± 1,6 <sup>**</sup>	14 ,27 ± 1,20 <sup>*</sup>
%	—	- 3,25%	- 18,86%	- 12,29%
<b>Taux d'hématocrite (%)</b>	48,33 ± 2,51	45,42±1,91	38,2 ± 4,62 <sup>***</sup>	41,57 ±4,13 <sup>*</sup>
%	—	- 6,02%	- 20,96%	- 13,98%
<b>VGM (fl)</b>	53,87 ± 1,00	52,22±0,57	51,71 ± 0,95 <sup>*</sup>	52,25 ±1,53
%	—	- 3,06%	- 4,00%	- 3,00%
<b>TGMH (g/dl)</b>	33,69 ±0,59	33,51±0,44	34,58 ± 0,77	33,95 ±0,51
<b>CCMH (pg)</b>	18,16 ± 0,65	17,77±0,42	17,14 ± 0,33	17,74 ± 0,60

Différence significative comparant au groupe témoin : \*P ≤ 0,05 ; \*\*\* P ≤ 0,001.

Différence significative comparant au groupe traité par l'arsenic : #P ≤ 0,05 ; ##P ≤ 0,01.

P : Seuil de signification.



**Figure 20.** Variation des globules rouges (x10<sup>6</sup>/μl), Taux d'hémoglobine (g/dl), Taux d'hématocrite (%), VGM (fl), des globules blancs (x10<sup>3</sup>/μl), Les plaquettes (x10<sup>3</sup>/μl), TGMH (g/dl) et CCMH (pg) chez les rats témoins et les traités ; par le sélénite de sodium, l'arsénite de sodium et à la combinaison (l'arsénite de sodium/sélénite de sodium) après 21 jours de traitement.

### 3. Etude de quelques paramètres biochimiques

Le tableau 9 et les figures (21, 22 et 23) montrent la variation de quelques paramètres biochimiques des rats témoins et rats traités après 21 jours de traitement.

#### 3.1. Bilan hépatique

##### ▣ Protéines totales et l'albumine

Nos résultats révèlent que l'administration de l'arsénite de sodium à 5,55 mg/kg de poids corporel chez les rats provoque une diminution hautement significative ( $P \leq 0,01$ ) de la teneur plasmatique en protéines totales (- 19,22%) et en albumine (- 12,88%). Par contre, chez les rats traités uniquement par le sélénite de sodium et par la combinaison arsénite de sodium/sélénite de sodium, on n'enregistre aucune différence significative comparant aux rats témoins.

##### ▣ Transaminases et la phosphatase alcaline

Le traitement des rats par l'arsénite de sodium induit une augmentation hautement significative ( $P \leq 0,01$ ) des transaminases ; TGO (+ 27,43%), TGP (+ 49,96%) et de la phosphatase alcaline (+ 69,82%) comparant au groupe témoin, et une augmentation significative ( $P \leq 0,05$ ) chez les rats traités par la combinaison Se/As et aucune différence significative chez les rats traités uniquement par le sélénite de sodium, toujours par rapport aux rats témoins.

##### ▣ Bilirubine totale

L'administration du l'arsénite de sodium à 5,55 mg/kg de poids corporel chez les rats induit une diminution significative ( $P \leq 0,05$ ) de la concentration plasmatique en bilirubine totale (- 32,98%). Tandis que, nos résultats ne montrent aucune variation statistiquement significative chez les rats traités ; par le sélénium et par la combinaison arsenic/sélénium comparativement aux rats témoins.

### 3.2. Bilan rénal

Les résultats montrent une augmentation très hautement significative ( $P \leq 0,001$ ) du taux sérique en créatinine (+ 64,5%) et en urée (+ 45,02%) comparant au groupe témoin. En revanche, on note une augmentation significative ( $P \leq 0,05$ ) de l'urée et la créatinine chez les rats traités par la combinaison l'arsénite de sodium/sélénite de sodium, et aucune différence significative chez les rats traités par le sélénium par rapport au lot témoin.

### 3.3. Bilan énergétique

D'après les résultats obtenus on observe une augmentation significative ( $P \leq 0,05$ ) de la concentration plasmatique en glucose chez le groupe traité par l'arsenic (+ 15,85%) comparant au groupe témoin, tandis que, la comparaison avec les groupes traités par le sélénium et par la combinaison As/Se ne présente aucune différence significative.

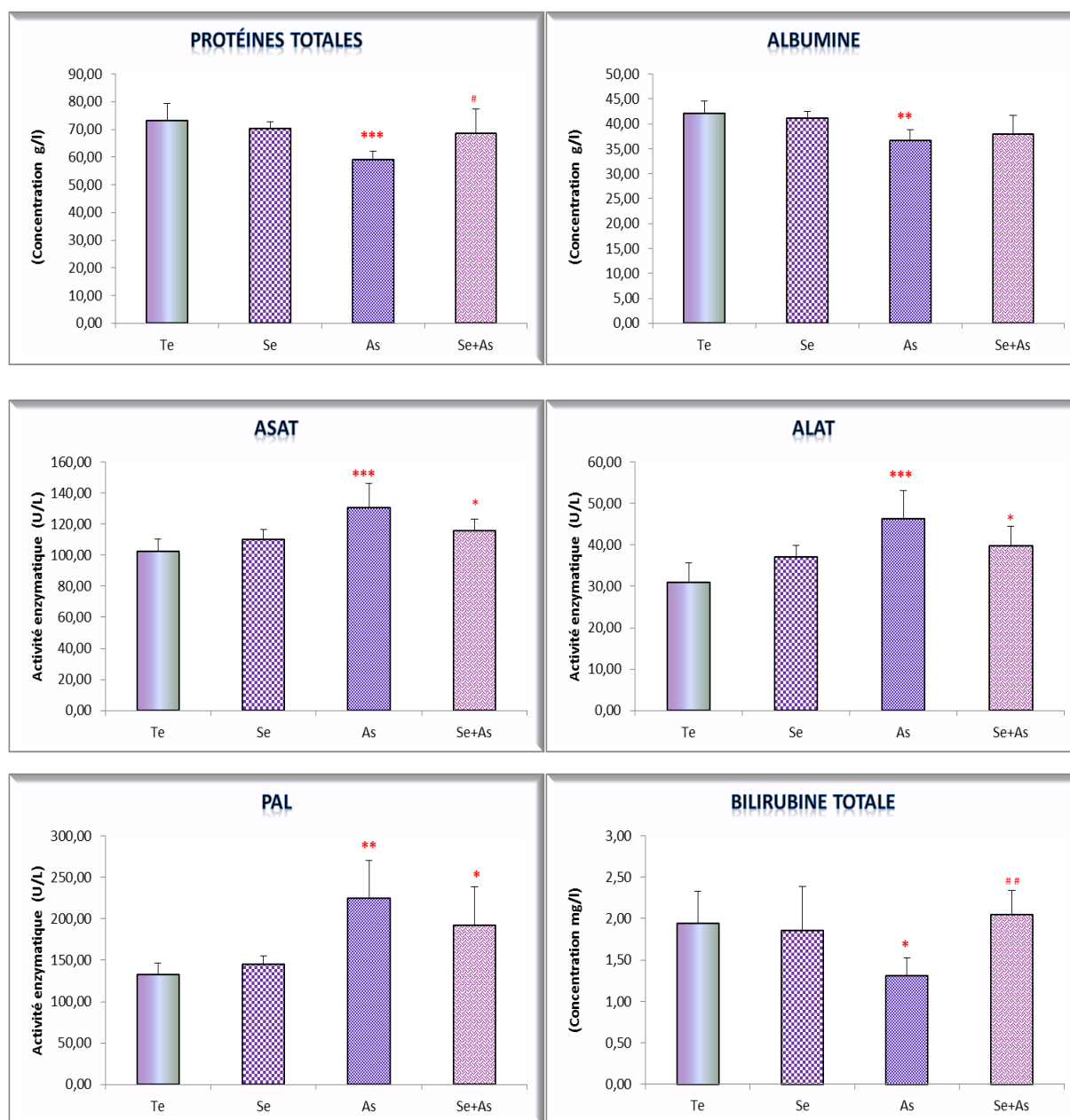
**Tableau 9.** Variation de quelques paramètres biochimiques chez les rats témoins et les traités; par le sélénite de sodium, l'arsénite de sodium et à la combinaison (l'arsénite de sodium/sélénite de sodium) après 21 jours de traitement.

Paramètres	Les lots expérimentaux			
	Témoin	Sélénium	Arsenic	Arsenic /Sélénium
<b>Protéine totale (g/l)</b>	73,25±6,13	70,25 ± 2,51	59,17 ± 2,89**	68,64 ± 8,58 #
%	—	- 4,09%	- 19,22%	- 6,29%
<b>Albumine (g/l)</b>	42,14 ± 2,45	41,14 ± 1,34	36,71 ± 2,12**	38 ± 3,71
%	—	- 2,37%	-12,88%	- 9,82%
<b>TGO (U/L)</b>	102,57 ± 7,92	110 ± 6,28	130,71 ± 15,38**	115,85 ± 7,34*
%	—	+ 7,24%	+ 27,43%	+ 12,94%
<b>TGP (U/L)</b>	30,86 ± 4,69	37 ± 2,85	46,28 ± 6,81**	39,71 ± 4,69*
%	—	+ 19,89%	+ 49,96%	+ 28,67%
<b>Phosphatase alcaline (U/L)</b>	132,57±13,76	145,14 ± 9,59	225,14 ± 44,97**	206,57 ± 62,36*
%	—	+ 9,48%	+ 69,82%	+ 55,81%
<b>Bilirubine totale (mg/l)</b>	1,94 ± 0,39	1,86 ± 0,52	1,30 ± 0,22*	2,04 ± 0,29##
%	—	- 4,12%	- 32,98%	+ 5,15%
<b>Créatinine (mg/dl)</b>	0,60 ± 0,10	0,60 ± 0,14	0,987 ± 0,09***	0,76 ± 0,11*,##
%	—	0%	+ 64,5%	+ 26,66%
<b>Urée (mg/dl)</b>	38,71 ± 5,10	39,85± 3,83	56,14 ± 7,02***	49,14 ± 6,97*
%	—	+ 2,94%	+ 45,02%	+ 26,94%
<b>Glucose (mg/dl)</b>	122,57 ±10,65	118,42±12,36	142 ± 13,42*	125,42 ±17,79
%	—	- 3,38%	+ 15,85%	+ 2,32%

Différence significative comparant au groupe témoin : \*P ≤ 0,05; \*\*P ≤ 0,01 ; \*\*\*P ≤ 0,001.

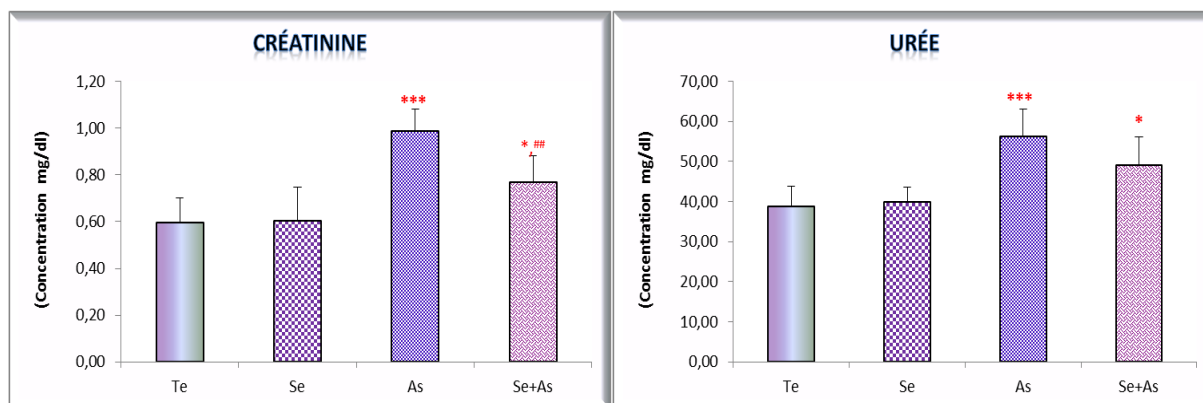
Différence significative comparant au groupe traité par l'arsenic : #P ≤ 0,05; ##P ≤ 0,01 ; ###P ≤ 0,001.

P : Seuil de signification

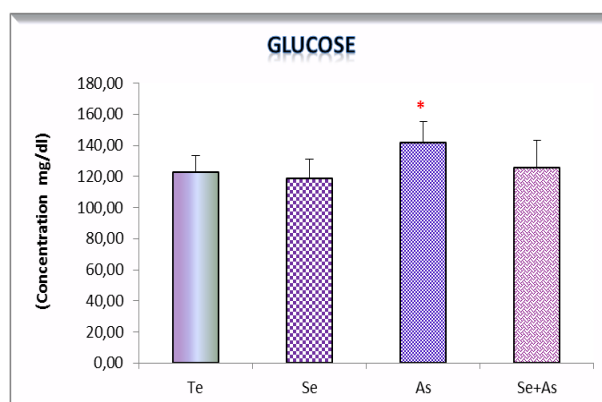


**Figure 21.** Variation de la concentration plasmatique des protéines totales, d'albumine (g/l), la bilirubine totale (mg/l) et l'activité enzymatique des transaminases et la phosphatase alcaline (UI/L) chez les rats témoins et les rats traités ; par le sélénite de sodium, l'arsénite de sodium et à la combinaison (l'arsénite de sodium/sélénite de sodium) après 21 jours de traitement.





**Figure 22.** Variation de la concentration plasmatique en créatinine et l'urée (mg/dl) chez les rats témoins et les traités ; par le sélénite de sodium, l'arsénite de sodium et à la combinaison (l'arsénite de sodium/sélénite de sodium) après 21 jours de traitement.



**Figure 23.** Variation de la concentration plasmatique en glucose (mg/dl) chez les rats témoins et les traités ; par le sélénite de sodium, l'arsénite de sodium et à la combinaison (l'arsénite de sodium/sélénite de sodium) après 21 jours de traitement.

#### 4. Etude de quelques paramètres du stress oxydant

Les paramètres du stress oxydant (MAD, GSH, GPx et GST) dans les organes (foie, reins et testicules) des rats traités et témoins après 21 jours de traitement sont présentés dans les tableaux 10 et 11.

**Tableau 10.** Variation de glutathion (nmol/mg prot) et de MDA (nmol/mg prot) dans les organes (Foie, rein et testicule) chez les rats témoins et traités ; par le sélénite de sodium, l'arsénite de sodium et à la combinaison (l'arsénite de sodium/sélénite de sodium) après 21 jours de traitement.

Paramètres	Les organes	Les lots expérimentaux			
		Témoin	Sélénium	Arsenic	Arsenic/Sélénium
MDA (n mol / mg prot )	Foie	0,40 ± 0,02	0,40 ± 0,02	0,53 ± 0,06**	0,43 ± 0,03#
	%	—	0%	+ 32,5%	+ 7,5%
	Rein	0,87 ± 0,13	0,91 ± 0,06	1,27 ± 0,16**	0,93 ± 0,09##
	%	—	+ 5,28%	+ 49,42%	+ 6,89%
	Testicules	0,20 ± 0,04	0,20 ± 0,04	0,21 ± 0,02	0,21 ± 0,03
	%	—	0%	+ 5%	+ 5%
GSH (n mol / mg prot)	Foie	123,60 ± 2,90	119,02 ± 3,74	89,13 ± 6,06***	108,45 ± 10,16*, ##
	%	—	-3,70%	- 27,88%	- 12,25%
	Reins	100,24 ± 4,76	113,04 ± 11,27	80,88 ± 4,22***	93,36 ± 5,47##
	%	—	+ 12,76%	- 19,31%	- 6,86%
	Testicules	74,45 ± 6,06	75,71 ± 4,65	61,40 ± 2,50***	68,29 ± 4,86#
	%	—	+ 1,69%	- 17,52%	- 8,27%

Différence significative comparant au groupe témoin : \*P ≤ 0,05; \*\*P ≤ 0,01 ; \*\*\*P ≤ 0,001.

Différence significative comparant au groupe traité par l'arsenic : #P ≤ 0,05; ##P ≤ 0,01 ; ###P ≤ 0,001.

P : Seuil de signification.

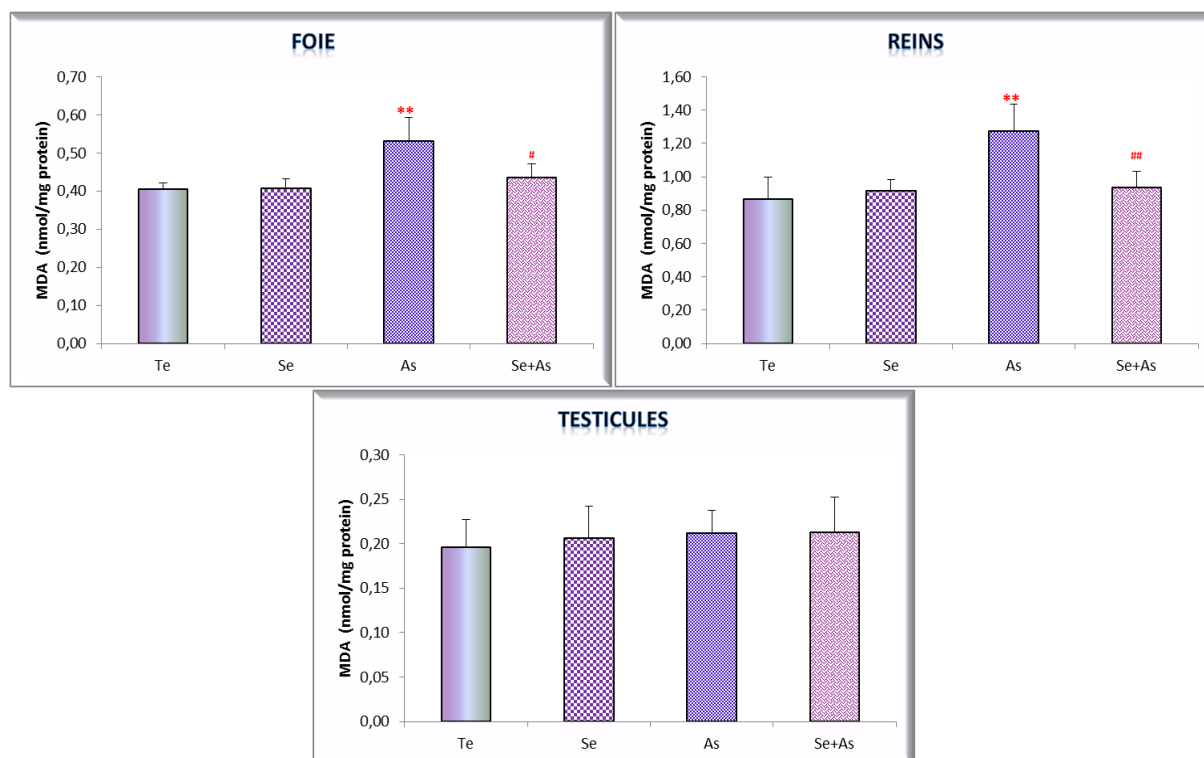
#### 4.1. Malondialdéhyde (MDA)

D'après les résultats obtenus (tab. 10 ; fig. 24) on observe une augmentation hautement significative ( $P \leq 0,01$ ) du taux de MDA dans les organes ; foie (+ 32,5%), reins (+ 42,49%) et aucune différence significative dans les testicules chez les rats traités par l'arsénite de sodium par rapport aux rats témoins. tandis que les rats traités par le sélénium et à la combinaison (arsénite de sodium/sélénite de sodium) ne montrent aucune variation significative du taux de MDA dans les organes, en comparant avec le groupe témoin.

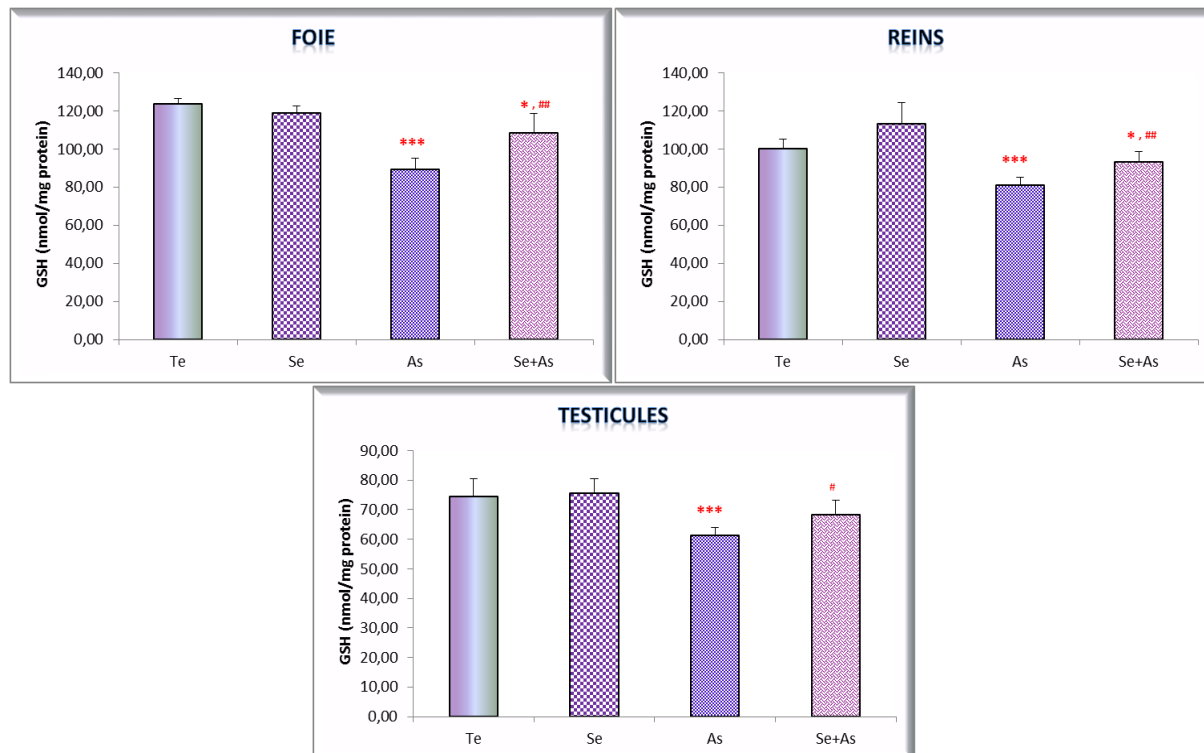
La co-administration de sélénium avec l'arsenic réduit significativement l'augmentation de taux de MDA dans les organes étudiés (Foie, reins, cœur et testicules) en comparant le groupe traité par (Se + As) avec le groupe traité uniquement par l'arsenic.

#### 4.2. Glutathion réduit (GSH)

Le traitement des rats par l'arsénite de sodium, à une dose de 5,55 mg/kg de poids corporel pendant 21 jours, entraîne une diminution très hautement significative ( $P \leq 0,001$ ) de la teneur cellulaire en glutathion dans les organes : foie (- 27,88%), reins (- 19,31%) et testicules (- 17,52%). En revanche, en comparant avec le groupe témoin, on enregistre une différence significative ( $P \leq 0,05$ ) de la teneur hépatique en glutathion (- 12,25%) et aucune différence significative dans les organes (reins et testicules) chez les rats traités par la combinaison (arsénite de sodium/sélénite de sodium), et aucune variation significative du taux de GSH dans les organes étudiés chez le groupe traité uniquement par le sélénium. Cependant, la comparaison entre le groupe traité par (Se + As) et le groupe traité uniquement par l'As montre une augmentation considérable du taux de GSH dans les organes étudiés (Foie, les reins et les testicules) (tab. 10 ; fig. 25).



**Figure 24.** Variation de malondialdéhyde (nmol/mg prot) dans les organes (Foie, reins et testicules) chez les rats témoins et traités par le sélénite de sodium, l'arsénite de sodium et à la combinaison (l'arsénite de sodium/sélénite de sodium) après 21 jours de traitement.



**Figure 25.** Variation de la teneur cellulaire en glutathion (nmol/mg prot) dans les organes (Foie, reins et testicules) chez les rats témoins et traités ; par le sélénite de sodium, l'arsénite de sodium et à la combinaison (l'arsénite de sodium/sélénite de sodium) après 21 jours de traitement.

#### 4.3. Glutathion peroxydase (GPx)

D'après le tableau 11 et la figure 26 on constate que le traitement des rats par l'arsénite de sodium provoque une diminution hautement significative ( $P \leq 0,01$ ) de l'activité enzymatique de la glutathion peroxydase (GPx) dans les organes ; foie (- 21,05%), reins (- 16,15%) et une diminution significative ( $P \leq 0,05$ ) dans les testicules (- 23,33%) en comparant au groupe témoin. En revanche, on n'enregistre aucune différence significative de la GPx chez les rats traités ; par le sélénite de sodium uniquement et par la combinaison l'arsénite de sodium/sélénite de sodium par rapport aux témoins. En revanche, la co-administration de Se avec l'As a augmenté significativement l'activité enzymatique de la GPx dans les organes ; foie et les reins, en comparant les groupes traités par l'arsenic et par la combinaison (Se/As).

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

L'administration du l'arsénite de sodium à 5,55 mg/kg de poids corporel pendant 21 jours chez les rats induit une augmentation très hautement significative ( $P \leq 0,001$ ) de l'activité enzymatique de la glutathion S-transférase (GST) dans le foie (+ 83,07 %), et une augmentation significative ( $P \leq 0,05$ ) dans les reins (+ 32,77 %) par rapport aux rats témoins. tandis que, on n'enregistre aucune différence significative chez les rats traités par ; le sélénite de sodium uniquement et par la combinaison Se/ As comparant aux rats témoins. La co-administration de sélénium avec l'arsenic a réduit significativement l'activité enzymatique de la GST dans les organes étudiés, en comparant le groupe traité par (sélénium + Arsenic) au groupe traité uniquement par l'arsenic (tab. 11 ; fig. 27).

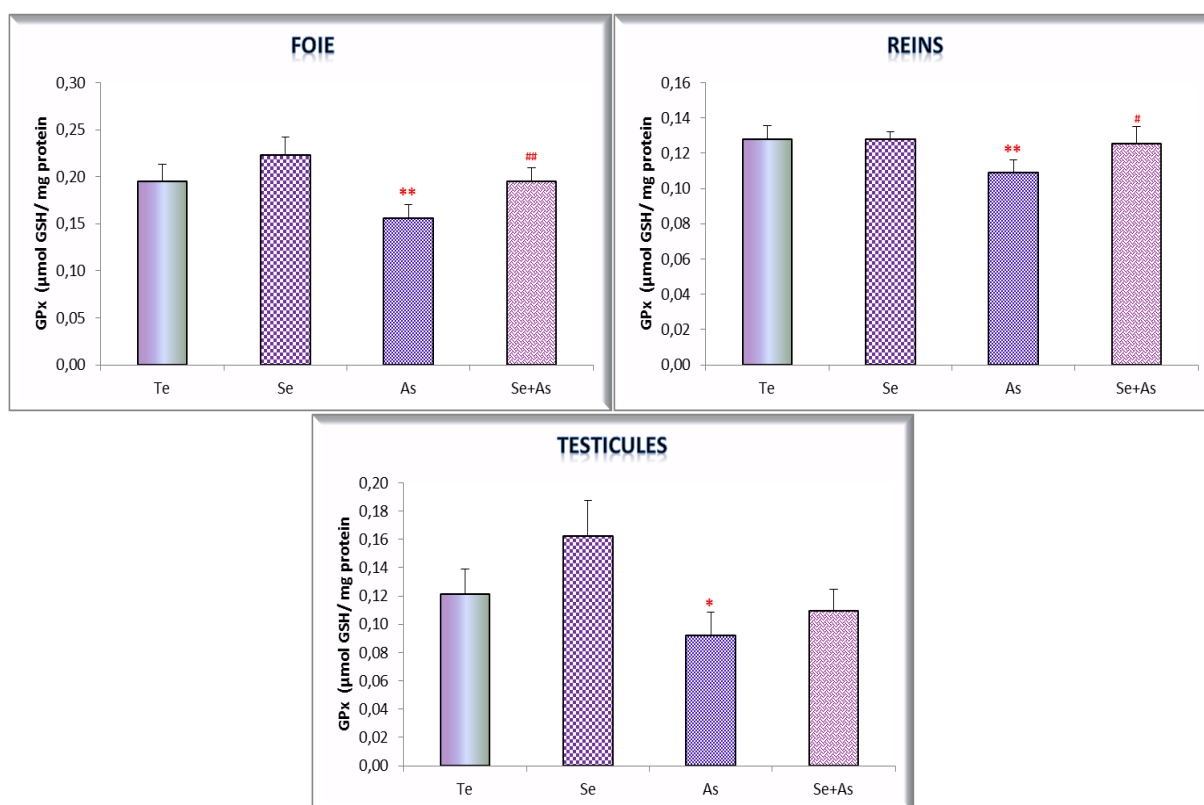
**Tableau 11.** Activité enzymatique de la GPx (mol GSH/mg prot) et de la GST (nmol GST/min/mg prot) dans les organes (Foie, reins et testicules) chez les rats témoins et traités par le sélénite de sodium, l'arsénite de sodium et à la combinaison (l'arsénite de sodium/sélénite de sodium) après 21 jours de traitement.

Paramètres	Les organes	Les lots expérimentaux			
		Témoin	Sélénium	Arsenic	Arsenic/Sélénium
GPx ( $\mu$ mol GSH/mg prot)	Foie	0,19 $\pm$ 0,02	0,22 $\pm$ 0,01	0,15 $\pm$ 0,014**	0,195 $\pm$ 0,014##
	%	-	+ 15,78%	- 21,05%	+ 2,63 %
	Rein	0,13 $\pm$ 0,01	0,128 $\pm$ 0,004	0,11 $\pm$ 0,007**	0,125 $\pm$ 0,009#
	%	-	- 1,53%	- 16,15%	- 3,84%
	Testicule	0,12 $\pm$ 0,02	0,16 $\pm$ 0,02	0,092 $\pm$ 0,016*	0,109 $\pm$ 0,015
	%	-	+ 33,33%	- 23,33%	- 9,16%
GST (nmol GST/min/mg prot)	Foie	1,95 $\pm$ 0,26	2,04 $\pm$ 0,25	3,57 $\pm$ 0,84***	2,35 $\pm$ 0,66#
	%	-	+ 4,61 %	+ 83,07 %	+ 20,51 %
	Rein	1,80 $\pm$ 0,33	2,00 $\pm$ 0,32	2,39 $\pm$ 0,34*	1,85 $\pm$ 0,34#
	%	-	+ 11,11 %	+ 32,77 %	+ 2,77 %

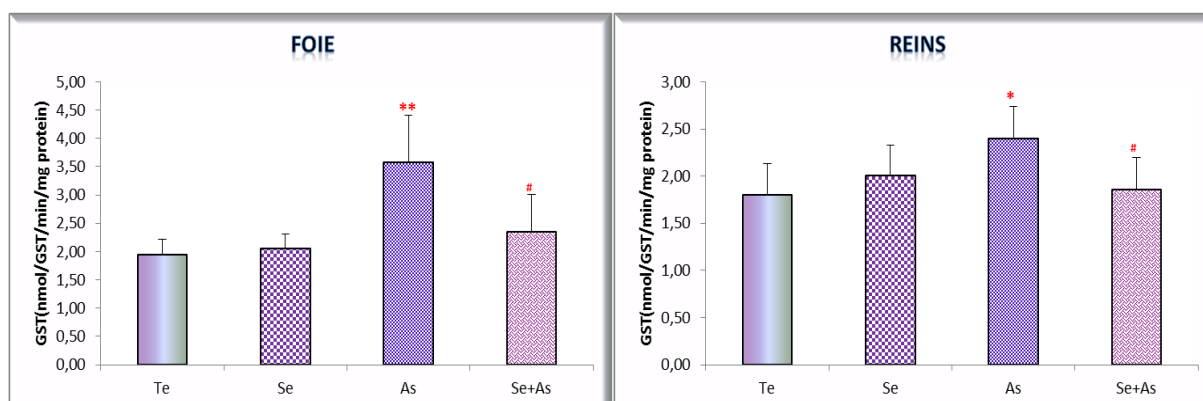
Différence significative comparant au groupe témoin : \*P  $\leq$  0,05; \*\*P  $\leq$  0,01 ; \*\*\*P  $\leq$  0,001.

Différence significative comparant au groupe traité par l'arsenic : #P  $\leq$  0,05; ##P  $\leq$  0,01 ; ###P  $\leq$  0,001.

P : Seuil de signification.



**Figure 26.** Variation de l'activité enzymatique de la glutathion peroxydase ( $\mu\text{mol GSH/mg prot}$ ) dans les organes (Foie, reins et testicules) chez les rats témoins et traités par le sélénite de sodium, l'arsénite de sodium et à la combinaison (l'arsénite de sodium/sélénite de sodium) après 21 jours de traitement.

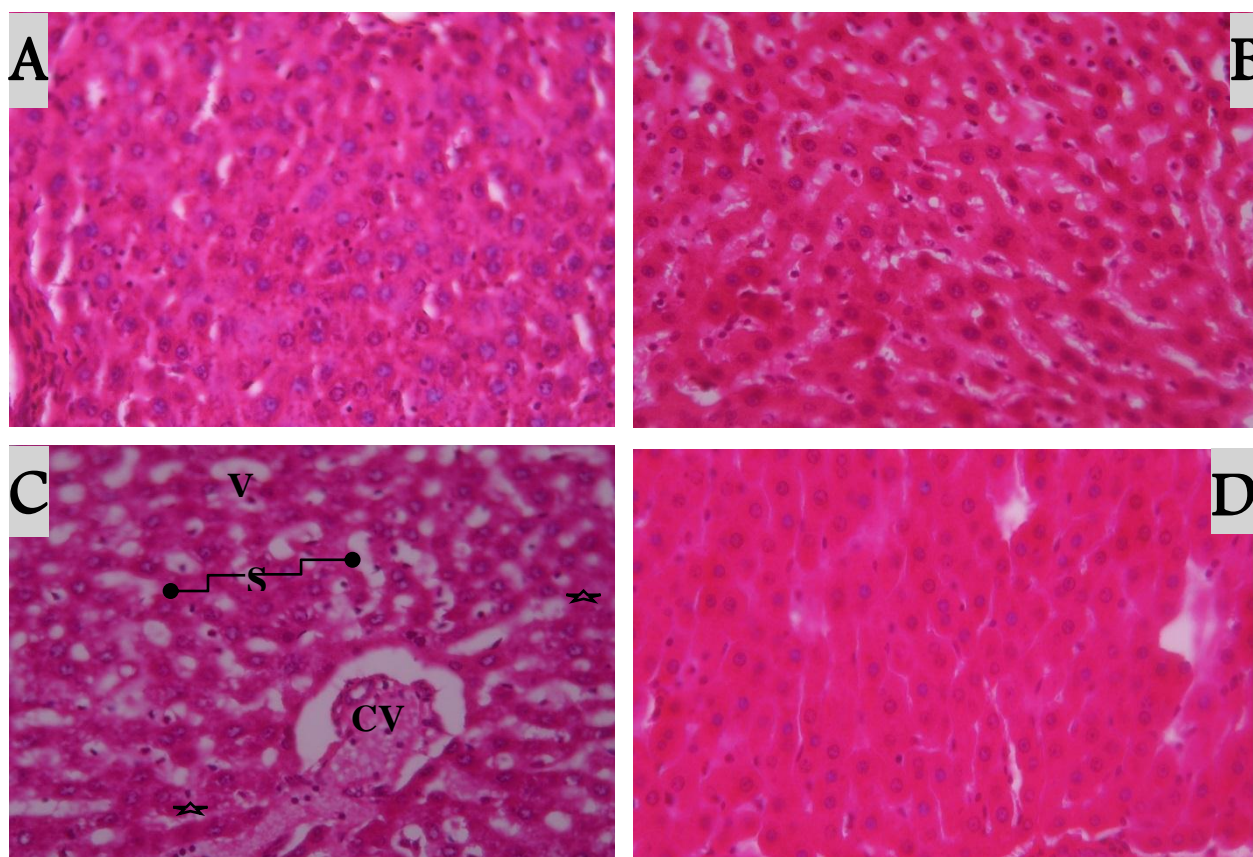




**Figure 27.** Variation de l'activité enzymatique de la glutathion S-transférase ( $\text{nmol GST/min/mg prot}$ ) dans les organes (Foie et reins) chez les rats témoins et traités par le sélénite de sodium, l'arsénite de sodium et à la combinaison (l'arsénite de sodium/sélénite de sodium) après 21 jours de traitement.

## 5. Etude histologique du foie

L'observation microscopique du foie des rats traités par l'arsénite de sodium à 5,55 mg/kg de poids corporel pendant 21 jours (fig. 28) révèle une modification cellulaire bien visible, qui se traduit par une dilatation des sinusoides, l'éclatement des hépatocytes et une nécrose cellulaire, ces altérations de la structure affectent par la suite la fonction hépatique et peuvent contribuer à un dysfonctionnement de cet organe. Alors que l'étude histologique du foie des rats traités par le sélénium et par la combinaison l'arsénite de sodium / sélénite de sodium ne présente aucune anomalie et ont une structure similaire à celle de témoin.





**Figure 28.** Les coupes histologiques de foie d'un rat témoin (A) et traités par le Se (B), l'As (C) et par la combinaison Se/As (D) colorées à Hématéine-Eosine 400X. CV; veine centrale, S; espace sinusoïdale, V; vacuolisation, ; Dilatation des sinusoides, ; nécrose

---

## CHAPITRE III : RÉSULTATS DE LA DEUXIÈME EXPÉRIMENTATION

---



### III. Résultats de la deuxième expérimentation

#### 1. Mesures des paramètres physico-chimiques

Les propriétés physico-chimiques de l'huile de lentisque sont indiquées dans le tableau 12.

**Tableau 12.** Les propriétés physico-chimiques de l'huile de lentisque

Paramètres physico-chimiques	Huile de Lentisque (n=3)
La densité relative	0.918 à 0.920
L'indice de réfraction	1.4691 à 1.4692
Acidité	2.955 ± 0.03
L'indice de saponification (mg KOH/g d'huile)	198.25 à 200.75
L'indice de peroxyde (meq/Kg)	2.1 à 2.3

#### 2. Etude pondérale

##### 2.1. Action sur la croissance corporelle

Au cours de la présente étude, on note une augmentation progressive de poids corporel chez les rats témoins (+ 43.14 g) et traités par PLo (+ 40.72 g) et une réduction de la prise pondérale (+ 15.86 g) chez les rats traités par la combinaison PLo/NaAsO<sub>2</sub>, alors que chez les rats traités par l'arsenic on enregistre une diminution significative ( $P \leq 0,05$ ) de poids corporel et une baisse du gain de poids (- 13.86 g) par rapport au groupe témoin (tab.13, fig.29).

##### 2.2. Action sur le poids relatif de certains organes

Les résultats obtenus montrent qu'il y a une augmentation très hautement significative ( $P \leq 0,001$ ) des poids relatif de foie et des reins, hautement significative ( $P \leq 0,01$ ) de poids relatif du cœur et une augmentation significative ( $P \leq 0,05$ ) de poids relatif des testicules chez le groupe traité par l'arsénite de sodium en comparant au groupe témoin. Par ailleurs, les analyses statistiques montrent qu'il n'y a pas de

variations significatives du poids relatif des organes étudiés chez les rats traités uniquement par PLo comparativement au groupe témoin. Par contre, chez le groupe traité par la combinaison PLo/l'arsénite de sodium on note une augmentation significative ( $P \leq 0,05$ ) du poids relatif de cœur par rapport au groupe témoin et une variation hautement significative ( $P \leq 0,01$ ) de poids relatif de foie et très hautement significative ( $P \leq 0,001$ ) de poids relatif des reins par rapport aux rats traités par l'arsénite de sodium (tab. 13; fig.30).

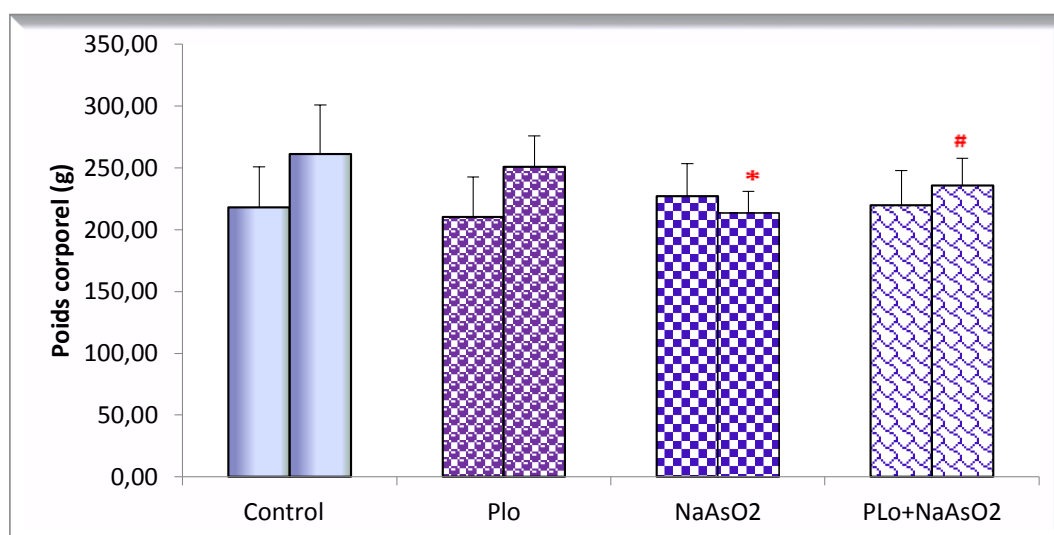
**Tableau 13.** Variation de poids corporel PC (g) et de poids relatif PR (g/100g de poids corporel) des organes (foie, reins, cœur et testicules) chez les rats témoins et les rats traités; par PLo, l'arsénite de sodium et à la combinaison (PLo/l'arsénite de sodium).

Paramètres	lots expérimentaux			
	Témoin	PLo	NaAsO <sub>2</sub>	PLo + NaAsO <sub>2</sub>
Poids initial (g)	218,00 ± 32,94	210,28 ± 32,24	227,28 ± 26,02	219,71 ± 27,90
Poids final (g)	261,14 ± 39,62	251,00 ± 24,86	213,42 ± 17,70*	235,57 ± 22,31 <sup>#</sup>
Gain de poids (g)	+ 43,14	+ 40,72	- 13,86	+ 15,86
Poids relatif du foie	3,22 ± 0,14	3,28 ± 0,11	4,08 ± 0,24***	3,54 ± 0,28 <sup>##</sup>
%		+ 1,86%	+ 26,70%	+ 9,93%
Poids relatif des reins	0,50 ± 0,04	0,52 ± 0,02	0,66 ± 0,038***	0,52 ± 0,029 <sup>###</sup>
%		+ 4%	+ 32%	+ 4%
Poids relatif du cœur	0,26 ± 0,02	0,30 ± 0,02	0,33 ± 0,023***	0,31 ± 0,012 <sup>*,#</sup>
%	-	+15,38%	+26,92 %	+19,23%
Poids relatif des testicules	1,10 ± 0,12	1,19 ± 0,11	1,28 ± 0,12*	1,23 ± 0,11
%	-	+8,18%	+16,36%	+11,81%

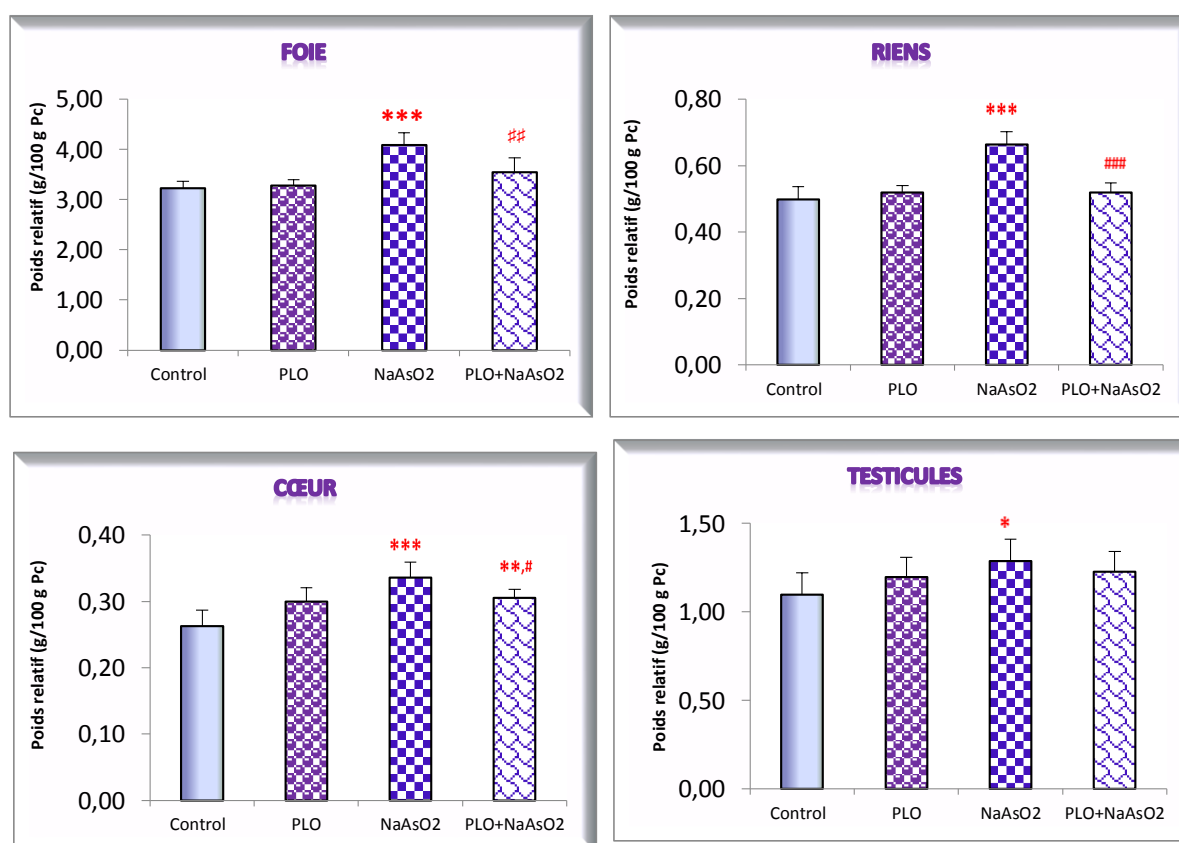
Différence significative comparant au groupe témoin : \*P ≤ 0,05 ; \*\*\*P ≤ 0,001.

Différence significative comparant au groupe traité par l'arsenic : <sup>#</sup>P ≤ 0,05; <sup>##</sup>P ≤ 0,01.

P : Seuil de signification.



**Figure 29.** Variation de poids corporel (Poids initial et final en g) des rats témoins et traités; par PLo, l'arsénite de sodium et à la combinaison (PLo/l'arsénite de sodium).



**Figure 30.** Variation de poids relatif des organes (Foie, reins, cœur et testicules) en g/100 g Pc chez les rats témoins et les rats traités; par PLo, l'arsénite de sodium et par la combinaison (PLo /l'arsénite de sodium).

### 3. Etude de quelques paramètres hématologiques

Nos résultats révèlent que le traitement par l'arsénite de sodium provoque une diminution très hautement significative ( $P \leq 0,001$ ) d'hémoglobine (- 15.03%), d'hématocrite (- 16.90%) et une diminution hautement significative ( $P \leq 0,01$ ) des globules rouges (- 18.70%) et du volume globulaire moyen (- 7.27%) comparant au groupe témoin. par ailleurs, on note une diminution significative ( $P \leq 0,05$ ) d'hémoglobine, du volume globulaire moyen et les globules rouges chez le groupe traité par (P<sub>Lo</sub> + NaAsO<sub>2</sub>) et aucune différence significative chez les rats traités uniquement par P<sub>Lo</sub> comparant au lot témoin. Par contre, l'huile de lentisque administrée avant et pendant le traitement par l'arsenic a significativement amélioré certains paramètres hématologiques qui ont été perturbés en présence d'arsenic en comparant le groupe (P<sub>Lo</sub> + NaAsO<sub>2</sub>) au groupe traité par l'arsenic (Voir tab. 14 ; fig. 31).

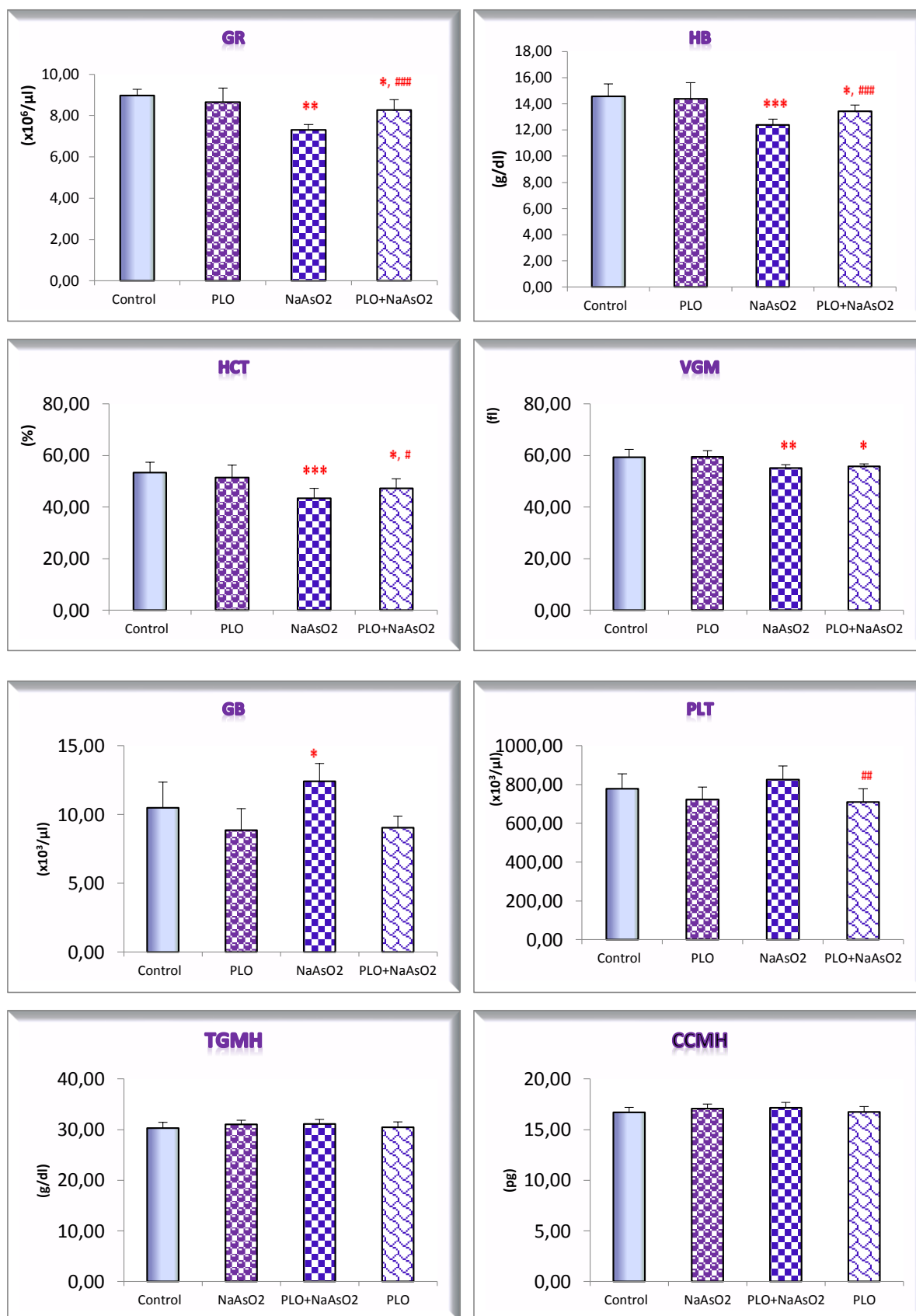
**Tableau 14.** Variation de quelques paramètres hématologiques chez les rats témoins et les rats traités; par PLo, l'arsénite de sodium et par la combinaison (PLO /l'arsénite de sodium).

Paramètres	Les lots expérimentaux			
	Témoin	PLO	NaAsO <sub>2</sub>	PLO + NaAsO <sub>2</sub>
Globules blancs (x10 <sup>3</sup> /μl)	10,49 ± 1,86	8,87 ± 1,56	12,41 ± 1,29*	9,06 ± 0,81
%		- 15,44%	+ 18,30%	- 13,63%
Les plaquettes (x10 <sup>3</sup> /μl)	779,00 ± 75,99	722,57 ± 63,24	824,85 ± 70,50	710,29 ± 66,90 ##
%		- 7,24%	- 105,88%	- 100,03%
Globules rouges (x10 <sup>6</sup> /μl)	8,98 ± 0,29	8,65 ± 0,68	7,30 ± 0,26**	8,27 ± 0,50*,###
%		- 3,67%	- 18,70%	- 7,90%
Taux d'hémoglobine (g/dl)	14,57 ± 0,95	14,38 ± 1,22	12,38 ± 0,42***	13,44 ± 0,48*,###
%		- 1,30%	- 15,03%	- 4,59%
Taux d'hématocrite (%)	53,40 ± 3,91	51,47 ± 4,82	43,35 ± 3,89***	47,19 ± 3,78*,#
%		- 3,61%	- 18,82%	- 11,62%
VGM (fl)	59,39 ± 3,04	59,45 ± 2,41	55,07 ± 1,30**	55,83 ± 0,93*
%		- 0,10%	- 7,27%	- 5,99%
TGMH (g/dl)	30,30 ± 1,17	30,44 ± 1,06	31,05 ± 0,79	31,09 ± 0,94
CCMH (pg)	16,70 ± 0,49	16,74 ± 0,52	17,07 ± 0,43	17,14 ± 0,52

Différence significative comparant au groupe témoin : \*P ≤ 0,05 ; \*\*\*P ≤ 0,001.

Différence significative comparant au groupe traité par l'arsenic : #P ≤ 0,05; ##P ≤ 0,01 ; ###P ≤ 0,001.

P : Seuil de signification.



**Figure 31.** Variation des globules rouges (x10<sup>6</sup>/μl), Taux d'hémoglobine (g/dl), Taux d'hématocrite (%), VGM (fl), des globules blancs (x10<sup>3</sup>/μl), Les plaquettes (x10<sup>3</sup>/μl), TGMH (g/dl) et CCMH (pg) chez les rats témoins et les rats traités; par PLo, l'arsénite de sodium et par la combinaison (PLO /l'arsénite de sodium).



#### 4. Etude des paramètres biochimiques

Le tableau 15 et les figures (32, 33 et 34) récapitulent la variation de quelques paramètres biochimiques des rats témoins et traités.

##### 4.1. Bilan hépatique

###### ▣ Protéines totales et l'albumine

L'analyse statistique de nos résultats expose que le traitement des rats par l'arsénite de sodium provoque une diminution très hautement significative ( $P \leq 0.001$ ) de la teneur plasmatique en protéines totales (-13.01%) et une diminution significative ( $P \leq 0,05$ ) en albumine (- 17.06%). En revanche, on note une diminution significative ( $P \leq 0,05$ ) en protéines totales chez les rats traités par la combinaison (P<sub>Lo</sub> + NaAsO<sub>2</sub>), et aucune différence significative chez les rats traités par P<sub>Lo</sub> par rapport au lot témoin.

###### ▣ Transaminases et la phosphatase alcaline

Le traitement des rats par l'arsénite de sodium induit une augmentation très hautement significative ( $P \leq 0.001$ ) des transaminases ; TGO (+ 56.70%), TGP (+ 69.38%) et de la phosphatase alcaline (+ 28.99%) comparativement au groupe témoin, et aucune différence significative chez les rats traités uniquement par P<sub>Lo</sub> et par (P<sub>Lo</sub> + NaAsO<sub>2</sub>) comparant aux rats témoins. La comparaison entre le groupe traité par (P<sub>Lo</sub> + NaAsO<sub>2</sub>) et le groupe traité par l'arsenic montre que la supplémentation de P<sub>Lo</sub> réduit l'activité enzymatique des transaminases et la phosphatase alcaline qui ont été élevés en présence d'arsenic.

###### ▣ la bilirubine totale

On a noté une légère augmentation en bilirubine totale chez les rats traités par l'arsenic mais statistiquement n'est pas significative.

## 4.2. Bilan rénal

Nos résultats révèlent une augmentation de la créatinine (+ 28.5%) et d'urée (+ 62.52%) chez le lot traité par l'arsenic avec une différence très hautement significative ( $P \leq 0,001$ ) par rapport au lot témoin. par ailleurs, on note une augmentation significative ( $P \leq 0,05$ ) du taux plasmatique en créatinine chez le groupe traité par (P<sub>Lo</sub> + NaAsO<sub>2</sub>) et aucune différence significative chez les rats traités uniquement par P<sub>Lo</sub> comparant au lot témoin. Concernant l'acide urique l'étude statistique ne montre aucune variation significative chez tous les lots traités par rapport au lot témoin.

## 4.3. Bilan énergétique et lipidique

### ▣ Glucose

D'après les résultats obtenus on observe une augmentation très hautement significative ( $P \leq 0,001$ ) de la concentration plasmatique en glucose chez le groupe traité par l'arsenic (+ 37.05%) comparant au groupe témoin, tandis que, la comparaison entre les groupes traités par P<sub>Lo</sub> et par (P<sub>Lo</sub> + NaAsO<sub>2</sub>) ne présente aucune différence significative par rapport au groupe témoin. En revanche, on note une variation très hautement significative ( $P \leq 0,001$ ) entre le groupe traité par l'arsenic et le groupe traité à la combinaison (P<sub>Lo</sub> + NaAsO<sub>2</sub>).

### ▣ Cholestérol total et les triglycérides

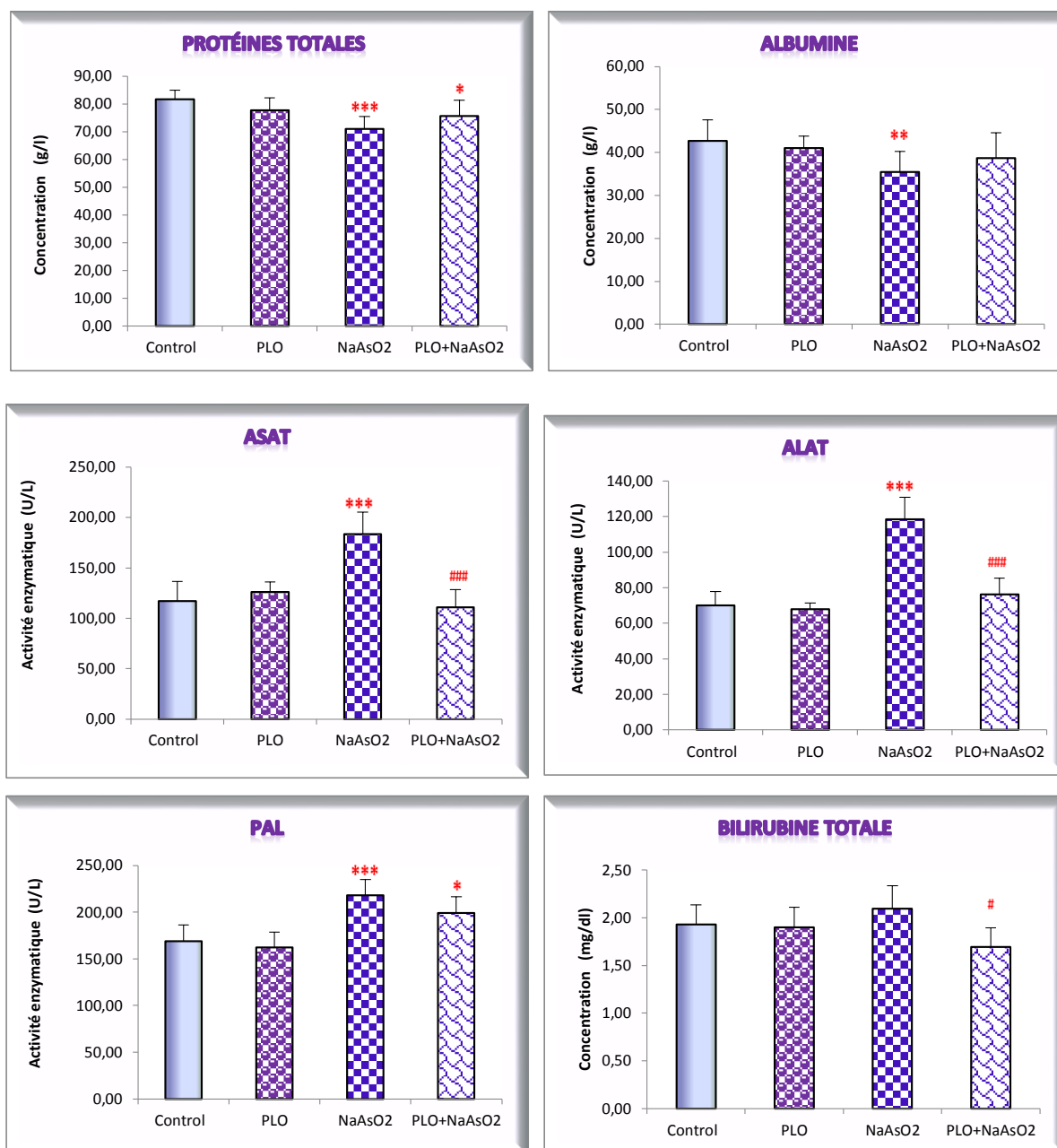
Dans nos conditions expérimentales, aucune variation statistiquement significative n'est enregistrée en Cholestérol total et en triglycérides chez tous les lots traités que ce soit par rapport au lot témoins, ou bien par rapport au lot traité par l'arsenic.

**Tableau 15.** Variation de quelques paramètres biochimiques chez les rats témoins et les rats traités; par PLo, l'arsénite de sodium et par la combinaison (PLo /l'arsénite de sodium).

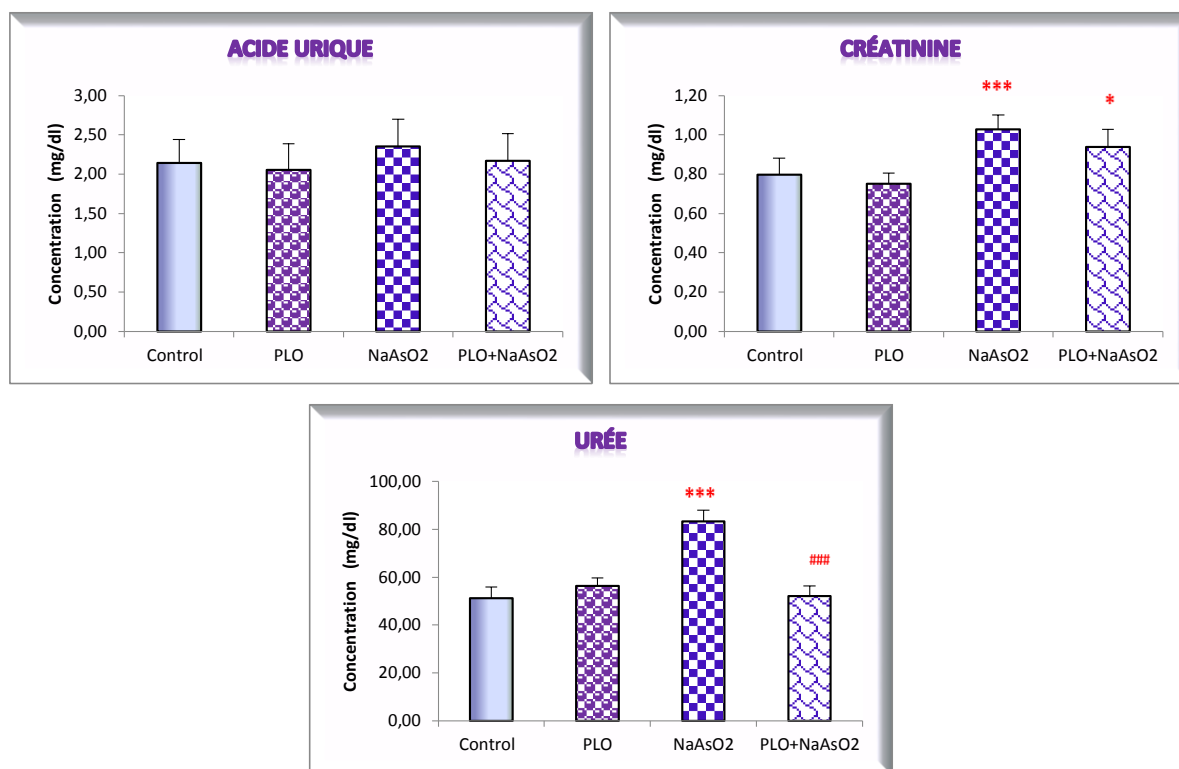
Paramètres	Les lots expérimentaux			
	Témoin	PLO	NaAsO <sub>2</sub>	PLO + NaAsO <sub>2</sub>
<b>Protéine totale (g/l)</b>	81,60 ± 3,31	77,64 ± 4,59	70,98 ± 4,46***	75,61 ± 5,66*
%	—	- 4,85%	- 13,01%	- 7,34%
<b>Albumine (g/l)</b>	42,71 ± 4,92	41 ± 2,82	35,42 ± 4,82*	38,71 ± 5,87
%	—	- 4,00%	- 17,06%	- 9,36%
<b>AST (U/L)</b>	117.14 ± 19.61	126±10.04	183.57 ± 21.82***	111.14 ± 17.19###
%	—	+ 7,56%	+ 56,70%	+ 5,12%
<b>ALT (U/L)</b>	70,00 ± 7,75	68 ± 3,42	118,57 ± 12,41***	76,29 ± 9,12###
%	—	- 2,85%	+ 69,38%	+ 8,98%
<b>PAL (U/L)</b>	169 ± 17,43	162,28 ± 16,53	218± 17,14***	199,28 ± 17,10*
%	—	- 4,14%	+ 28,99%	+ 17,91%
<b>Bilirubine T (mg/l)</b>	1,93 ± 0,21	1,90 ± 0,20	2,09 ± 0,23	1,69 ± 0,20#
<b>Créatinine (mg/dl)</b>	0,80 ± 0,09	0,75 ± 0,05	1,028 ± 0,07***	0,94 ± 0,09*
%	—	- 6,25%	+ 28,5%	+ 17,5%
<b>Urée (mg/dl)</b>	51,31 ± 4,64	56,48 ± 3,35	83,39 ± 4,72***	52,21 ± 4,14###
%	—	+ 10.07%	+ 62.52%	+ 1.75%
<b>Acide urique (mg/dl)</b>	2.14 ± 0.30	2.05 ± 0.33	2.35 ± 0.35	2.17 ± 0.34
<b>Glucose (mg/dl)</b>	113.34 ± 8.58	108.56 ± 9.33	155.34 ± 8,71***	119.61 ± 10.1###
%	—	- 4.21%	+ 37.05%	+ 5.53%
<b>Cholestérol T (mg/dl)</b>	73,88 ± 6,60	72,64 ± 8,43	80,00 ± 8,44	76,50 ± 9,10
<b>Triglycérides (mg/dl)</b>	100,29 ± 12,34	96,42 ± 9,51	96,42 ± 11,61	92,71 ± 12,39

Différence significative comparant au groupe témoin : \*P ≤0,05; \*\*p≤0,01 ; \*\*\*p≤0,001,  
 Différence significative comparant au groupe traité par l'arsenic : #p≤0,05; ##p≤0,01 ;  
 ###p≤0,001.

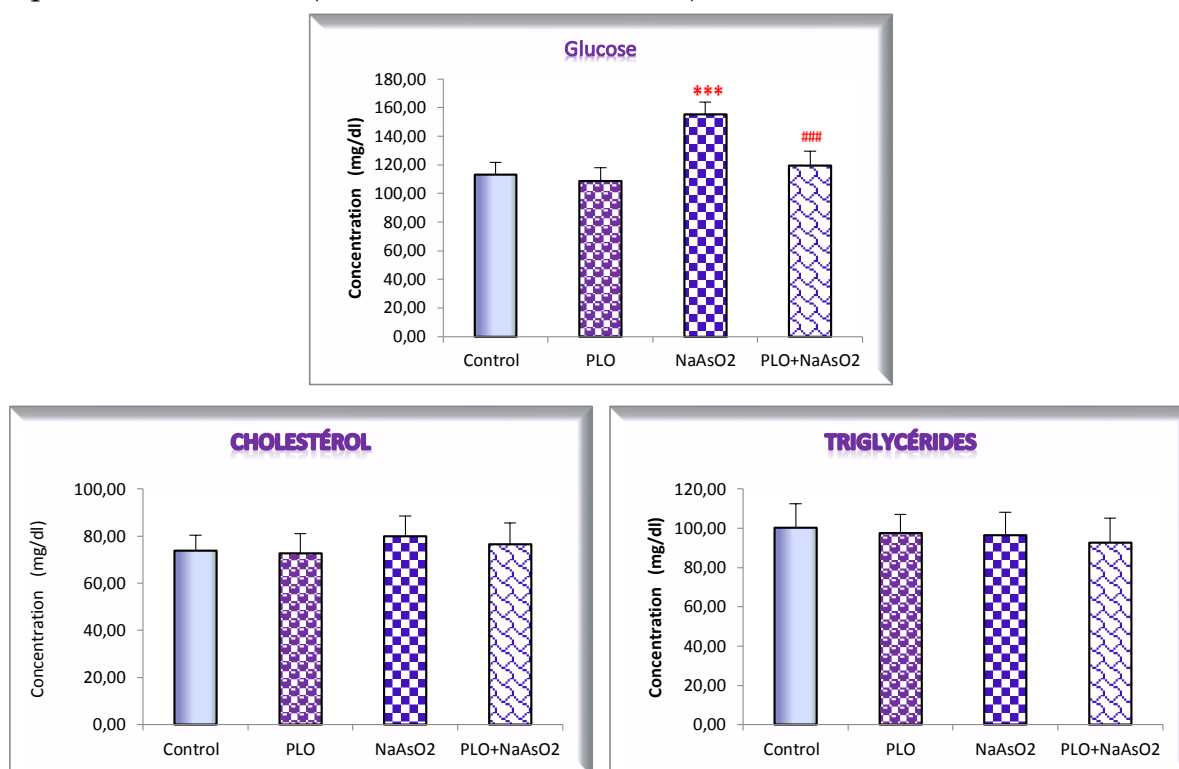
P : Seuil de signification.



**Figure 32.** Variation de la concentration plasmatique des protéines totales et d'albumine en (g/l), bilirubine totale (mg/l) et l'activité enzymatique des transaminases et la phosphatase alcaline (UI/L) chez les rats témoins et les traités; par PLo, l'arsénite de sodium et par la combinaison (PLo /l'arsénite de sodium).



**Figure 33.** Variation de la concentration plasmatique en créatinine, l'urée et l'acide urique (mg/dl) chez les rats témoins et les rats traités ; par PLo, l'arsénite de sodium et par la combinaison (PLo /l'arsénite de sodium).



**Figure 34.** Variation de la concentration plasmatique en glucose, cholestérol et triglycérides en (mg/dl) chez les rats témoins et les rats traités; par PLo, l'arsénite de sodium et par la combinaison (PLo /l'arsénite de sodium).

## 5. Etude de quelques paramètres du stress oxydant

### 5.1. Les paramètres non enzymatiques

#### 5.1.1. Malondialdéhyde (MDA)

D'après les résultats obtenus (tab. 16 ; fig. 35) on observe une augmentation très hautement significative ( $P \leq 0,001$ ) du taux de MDA dans les organes ; foie (+ 169.04%), cœur (+ 20.37%) et une augmentation hautement significative ( $P \leq 0,01$ ) et significative ( $P \leq 0,05$ ) dans les reins et les testicules respectivement chez les rats traités par l'arsénite de sodium par rapport aux rats témoins, tandis que les rats traités par le PLo et à la combinaison (PLo + NaAsO<sub>2</sub>) ne montrent aucune variation significative du taux de MDA dans les organes (Foie, reins, cœur et testicules), en comparant avec le groupe témoin. Cependant, les rats recevant un pré/co-traitement par l'huile de lentisque (PLo + NaAsO<sub>2</sub>) avaient un taux de MDA significativement bas comparativement au groupe traité uniquement par l'arsenic.

#### 5.1.2. Glutathion réduit (GSH)

L'administration de l'arsénite de sodium chez les rats provoque une diminution hautement significative ( $P \leq 0,01$ ) de la teneur cellulaire en glutathion dans les organes ; le foie (- 12.67%) et les reins (- 13.04%) et une diminution très hautement significative ( $P \leq 0,001$ ) dans le cœur (- 20.50%) et les testicules (- 26.52%). En revanche, chez les rats traités par (PLo + NaAsO<sub>2</sub>) on marque une différence significative ( $P \leq 0,05$ ) en glutathion dans le cœur et une différence hautement significative ( $P \leq 0,01$ ) dans les testicules comparativement avec le groupe témoin, par contre chez les rats recevant un pré/co-traitement à l'huile de lentisque (PLo + arsenic) le taux de GSH a été significativement restauré dans les organes étudiés surtout dans le foie, les reins et le cœur par rapport aux rats traités uniquement par l'arsenic (tab. 16 ; fig. 36).

### 5.1.3. Les métallothionines (MTs)

Le traitement statistique de nos résultats montre une diminution hautement significative ( $P \leq 0,01$ ) de la teneur cellulaire en MTs dans le foie, les reins et une diminution significative ( $P \leq 0,05$ ) dans le cœur chez les rats traités par l'arsénite de sodium par rapport aux rats témoins. Tandis que, les rats traités par le PLo et à la combinaison (PLo + NaAsO<sub>2</sub>) ne montrent aucune variation significative du taux de MTs dans les organes étudiés comparativement au groupe témoin. Le pré/co-traitement par PLo avec l'arsenic augmente significativement la teneur cellulaire en MTs dans les organes étudiés (Foie, reins, cœur) en comparant le groupe traité par (PLo + NaAsO<sub>2</sub>) au groupe traité par l'arsenic (tab. 16 ; fig. 37).

**Tableau 16.** Variation de MDA (nmol/mg prot), GSH (nmol/mg prot) et MTs ( $\mu\text{g/g}$  prot) dans les organes (Foie, reins, cœur et testicules) chez les rats témoins et les rats traités; par PLo, l'arsénite de sodium et par la combinaison (PLo /l'arsénite de sodium).

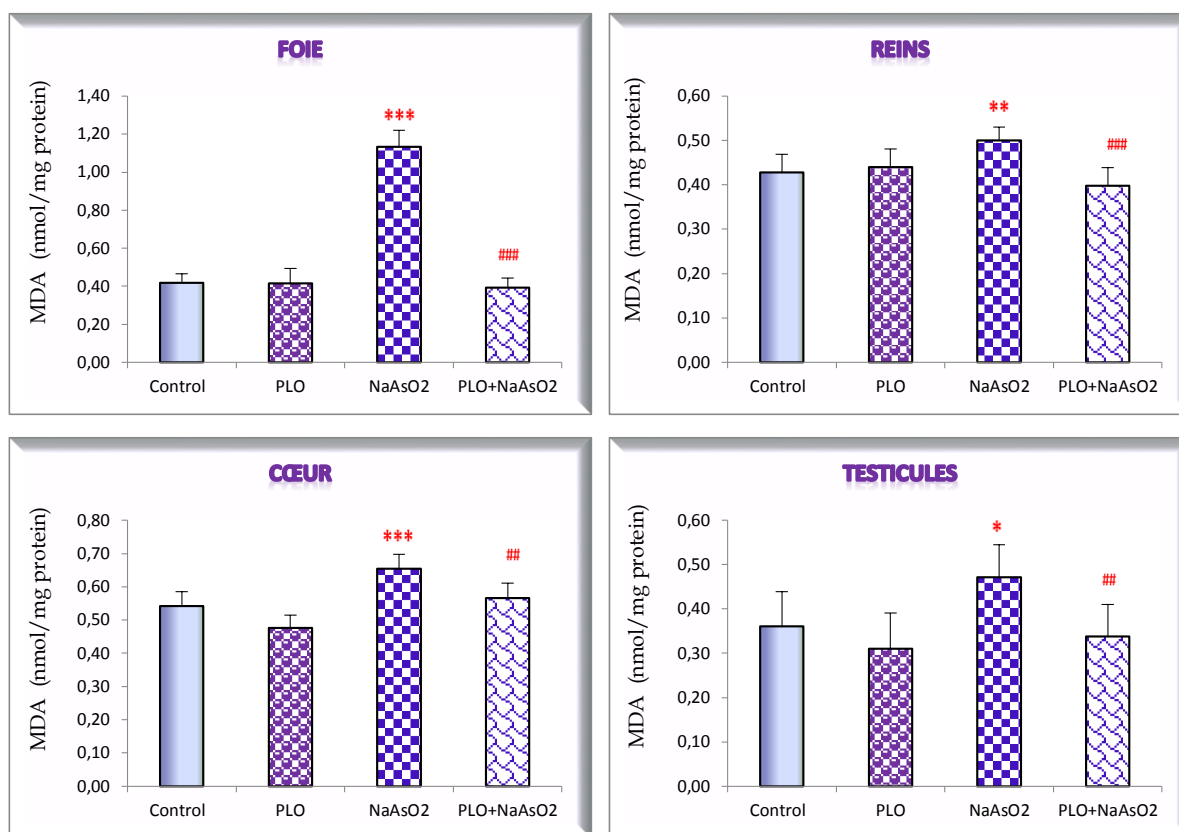
Paramètres	Les organes	Les lots expérimentaux			
		Témoin	NaAsO <sub>2</sub>	PLO + NaAsO <sub>2</sub>	PLO
MDA (nmol/mg protein)	<i>Foie</i>	0,42 $\pm$ 0,05	1,13 $\pm$ 0,08***	0,39 $\pm$ 0,05###	0,41 $\pm$ 0,07
	%	—	+ 169,04%	-7,14%	- 2,38%
	<i>Reins</i>	0,43 $\pm$ 0,04	0,50 $\pm$ 0,03**	0,40 $\pm$ 0,040###	0,44 $\pm$ 0,041
	%	—	+ 16,27%	- 6,97%	+ 2,32%
	<i>Cœur</i>	0,54 $\pm$ 0,04	0,65 $\pm$ 0,04***	0,57 $\pm$ 0,043##	0,47 $\pm$ 0,038
	%	—	+ 20,37%	+ 5,55%	-12,96%
	<i>Testicules</i>	0,36 $\pm$ 0,08	0,47 $\pm$ 0,07*	0,34 $\pm$ 0,072##	0,31 $\pm$ 0,08
	%	—	+ 30,55%	- 5,55%	- 13,88%
GSH (nmol/mg protein)	<i>Foie</i>	96,78 $\pm$ 7,18	84,51 $\pm$ 6,68**	99,93 $\pm$ 8,37##	106,64 $\pm$ 7,22
	%	—	- 12,67%	+ 3,25%	+ 10,18%
	<i>Reins</i>	75,76 $\pm$ 5,36	65,88 $\pm$ 4,79**	75,92 $\pm$ 5,14##	74,87 $\pm$ 5,19
	%	—	- 13,04%	+ 0,21%	- 1,17%
	<i>Cœur</i>	88,17 $\pm$ 4,05	70,09 $\pm$ 4,87***	83,00 $\pm$ 4,63*, ###	87,47 $\pm$ 3,26
	%	—	- 20,50%	- 5,86%	- 0,79%
	<i>Testicules</i>	64,95 $\pm$ 5,60	47,72 $\pm$ 5,35***	54,51 $\pm$ 4,12**, #	63,45 $\pm$ 3,92
	%	—	- 26,52%	- 16,07%	- 2,30%
MTs ( $\mu\text{g/g}$ prot)	<i>Foie</i>	70,38 $\pm$ 5,47	53,11 $\pm$ 5,84**	67,24 $\pm$ 6,69#	77,99 $\pm$ 4,94
	%	—	- 24,53%	- 4,46%	+ 10,81%
	<i>Reins</i>	37,62 $\pm$ 2,66	29,52 $\pm$ 3,33**	39,51 $\pm$ 3,43##	36,59 $\pm$ 2,71
	%	—	- 21,53%	+ 5,02%	- 2,73%
	<i>Cœur</i>	35,23 $\pm$ 5,12	29,26 $\pm$ 4,22*	35,32 $\pm$ 4,66#	39,13 $\pm$ 5,47
	%	—	- 16,94%	+ 0,25%	+ 11,07%

Différence significative comparant au groupe témoin : \*P  $\leq$  0,05; \*\*p $\leq$  0,01 ; \*\*\*p $\leq$  0,001.

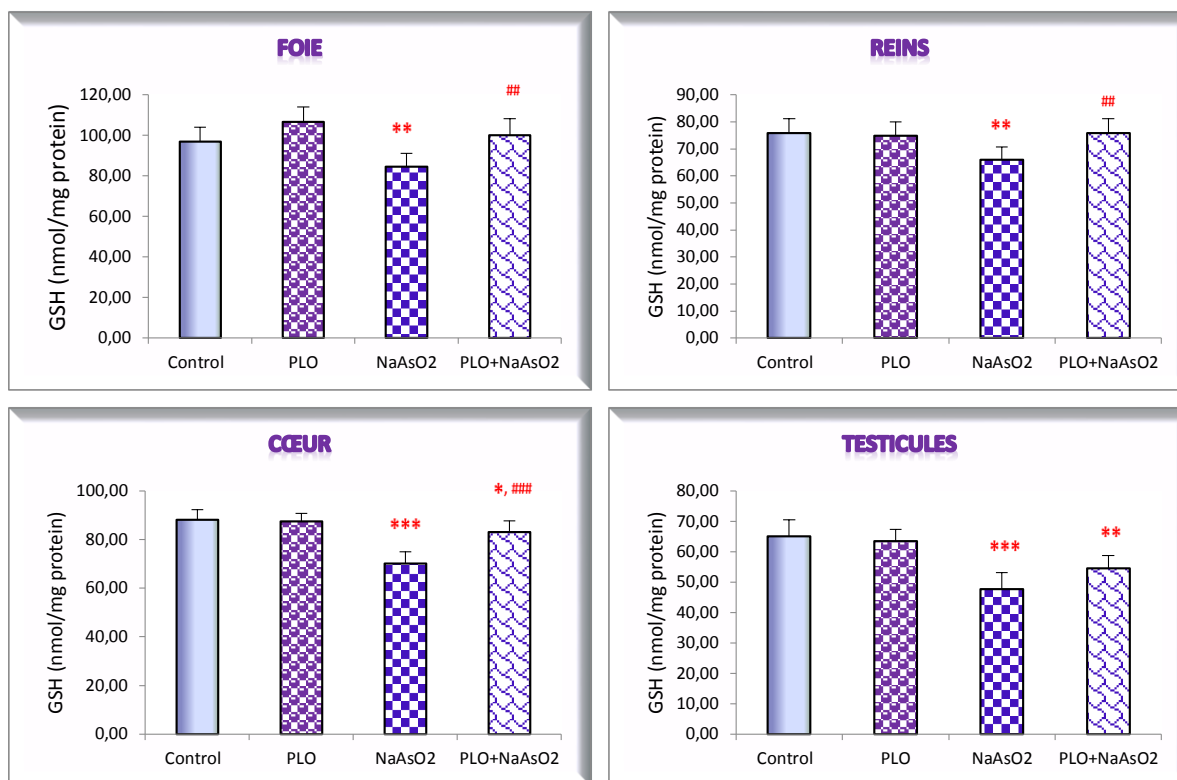
Différence significative comparant au groupe traité par l'arsenic : # p $\leq$  0,05; ##p $\leq$  0,01 ; ###p $\leq$  0,001.

P : Seuil de signification.

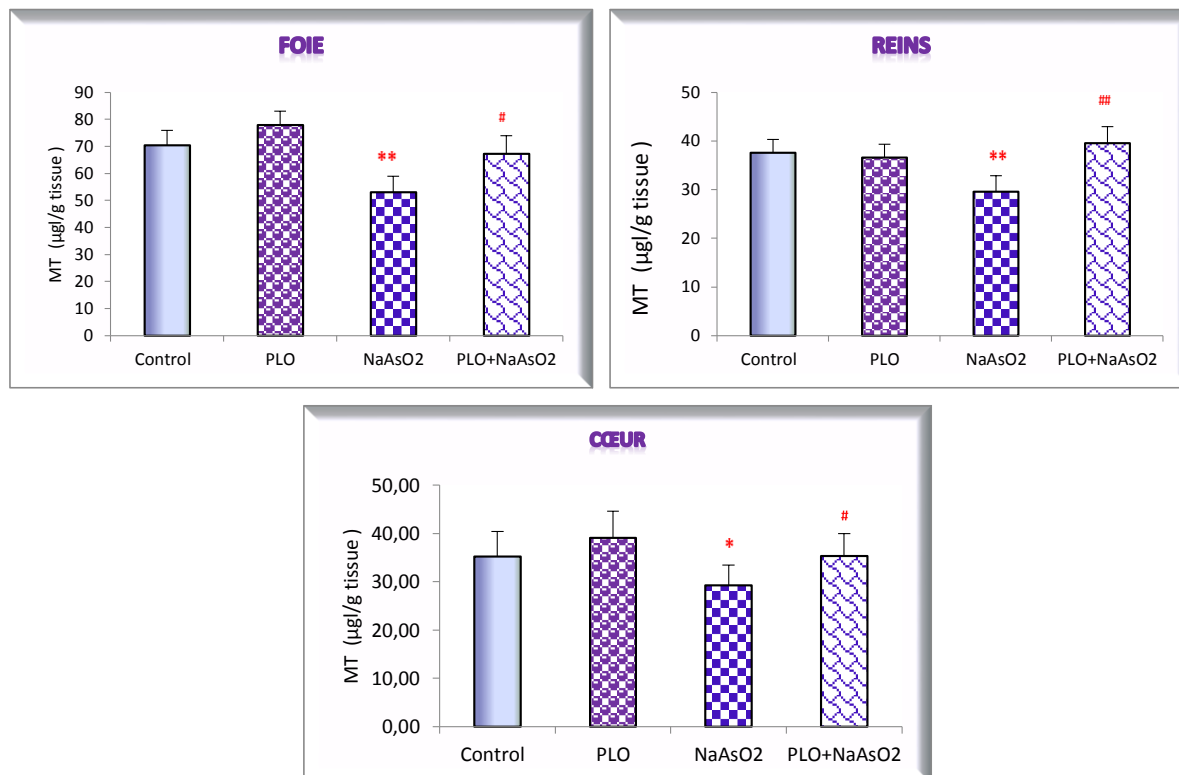




**Figure 35.** Variation du malondialdéhyde (nmol/mg prot) dans les organes (Foie, reins, cœur et testicules) chez les rats témoins les rats traités; par PLo, l'arsénite de sodium et par la combinaison (PLo /l'arsénite de sodium).



**Figure 36.** Variation de la teneur cellulaire en glutathion (nmol/mg prot) dans les organes (Foie, reins, cœur et testicules) chez les rats témoins et les rats traités; par PLo, l'arsénite de sodium et par la combinaison (Plo /l'arsénite de sodium).



**Figure 37.** Variation de la teneur cellulaire en métallothionéines (µg/g d'organe) dans les organes (Foie, reins et cœur) chez les rats témoins et les rats traités; par PLo, l'arsénite de sodium et par la combinaison (Plo /l'arsénite de sodium).

## 5.2. Les enzymes antioxydantes

Les activités de certaines enzymes antioxydantes (GPx, GST, CAT et SOD) sont représentées dans les tableaux (17 et 18) et les figures (38, 39, 40 et 41).

### 5.2.1. La Glutathion peroxydase (GPx)

Le traitement des rats par l'arsénite de sodium provoque une diminution hautement significative ( $P \leq 0,01$ ) de l'activité enzymatique de la glutathion peroxydase (GPx) dans les organes ; foie (- 34.78%), reins (- 18.82%) et une diminution très hautement significative ( $P \leq 0,001$ ) et significative ( $P \leq 0,05$ ) dans le cœur et les testicules respectivement comparativement aux rats témoins. En revanche, aucune variation significative de la GPx chez les rats traités uniquement par le PLo et traités (PLo + NaAsO<sub>2</sub>) par rapport aux rats témoins. Cependant, la comparaison entre le groupe traité uniquement par l'arsenic et par la combinaison (PLo + Arsenic) montre une augmentation significative ( $P \leq 0,05$ ) de la GPx dans le foie, le cœur et les reins chez le groupe traité par (PLo + Arsenic).

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

L'administration de l'arsénite de sodium chez les rats induit une augmentation très hautement significative ( $P \leq 0,001$ ) de l'activité enzymatique de la glutathion S-transférase (GST) dans les organes ; reins, cœur et les testicules, et une augmentation hautement significative ( $P \leq 0,01$ ) dans le foie. Alors que, aucune différence significative est marquée chez les rats traités par ; le PLo uniquement et par la combinaison PLo/As comparant aux rats témoins. La pré/co-administration de PLo avec l'arsenic réduit l'augmentation de l'activité enzymatique de la GST dans les organes étudiés, en comparant le groupe traité par (PLo + Arsenic) au groupe traité uniquement par l'arsenic.

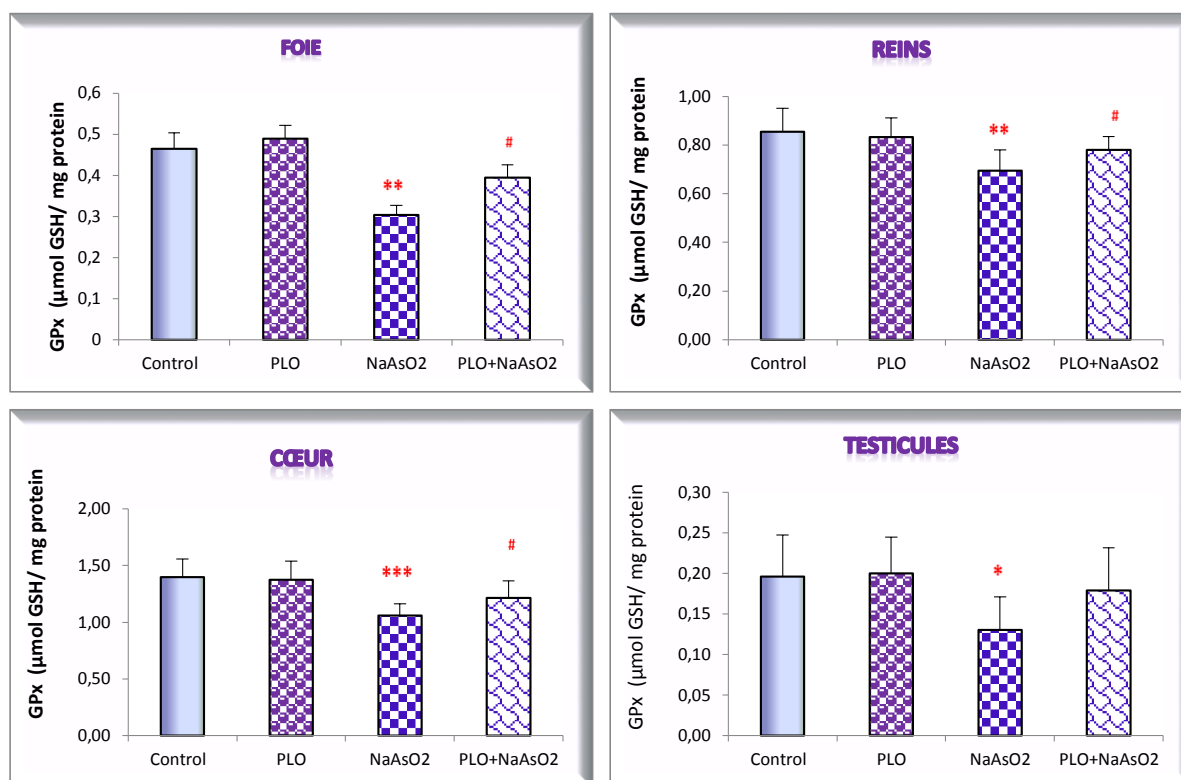
**Tableau 17.** Activité enzymatique de la GPx (mol GSH/mg prot) et de la GST (nmol GST/min/mg prot) dans les organes (Foie, reins, cœur et testicules) chez les rats témoins et les rats traités; par PLo, l'arsénite de sodium et par la combinaison (PLo /l'arsénite de sodium).

Paramètres	Les organes	Les lots expérimentaux			
		Témoin	NaAsO <sub>2</sub>	PLO + NaAsO <sub>2</sub>	PLO
GPx ( $\mu$ mol GSH / mg prot)	<i>Foie</i>	0,46 $\pm$ 0,038	0,304 $\pm$ 0,023**	0,39 $\pm$ 0,03 <sup>#</sup>	0,48 $\pm$ 0,03
	%	—	- 34,78%	- 15,21%	+4,34%
	<i>Reins</i>	0,85 $\pm$ 0,096	0,69 $\pm$ 0,086**	0,77 $\pm$ 0,054 <sup>#</sup>	0,83 $\pm$ 0,079
	%	—	- 18,82%	- 9,41%	- 2,35%
	<i>Cœur</i>	1,39 $\pm$ 0,15	1,05 $\pm$ 0,010***	1,21 $\pm$ 0,15 <sup>#</sup>	1,37 $\pm$ 0,16
	%	—	- 24,46%	- 12,94%	- 1,43%
	<i>Testicules</i>	0,19 $\pm$ 0,05	0,13 $\pm$ 0,04*	0,17 $\pm$ 0,05	0,20 $\pm$ 0,04
	%	—	- 31,57%	- 10,52%	+ 5,26%
GST (nmol GST/min/mg prot)	<i>Foie</i>	2,44 $\pm$ 0,19	3,67 $\pm$ 0,23**	3,18 $\pm$ 0,20	2,91 $\pm$ 0,20
	%	—	+ 50,40%	+ 30,32%	+19,26%
	<i>Reins</i>	1,24 $\pm$ 0,046	1,69 $\pm$ 0,08***	1,34 $\pm$ 0,07###	1,29 $\pm$ 0,067
	%	—	+ 36,29%	+ 8,06%	+ 4,03%
	<i>Cœur</i>	0,34 $\pm$ 0,042	0,66 $\pm$ 0,057***	0,43 $\pm$ 0,046###	0,36 $\pm$ 0,044
	%	—	+ 94,11%	+ 26,47%	+ 5,88%
	<i>Testicules</i>	0,24 $\pm$ 0,022	0,36 $\pm$ 0,04***	0,31 $\pm$ 0,048 <sup>#</sup>	0,29 $\pm$ 0,03
	%	—	+ 50%	+ 29,16%	+ 20,83%

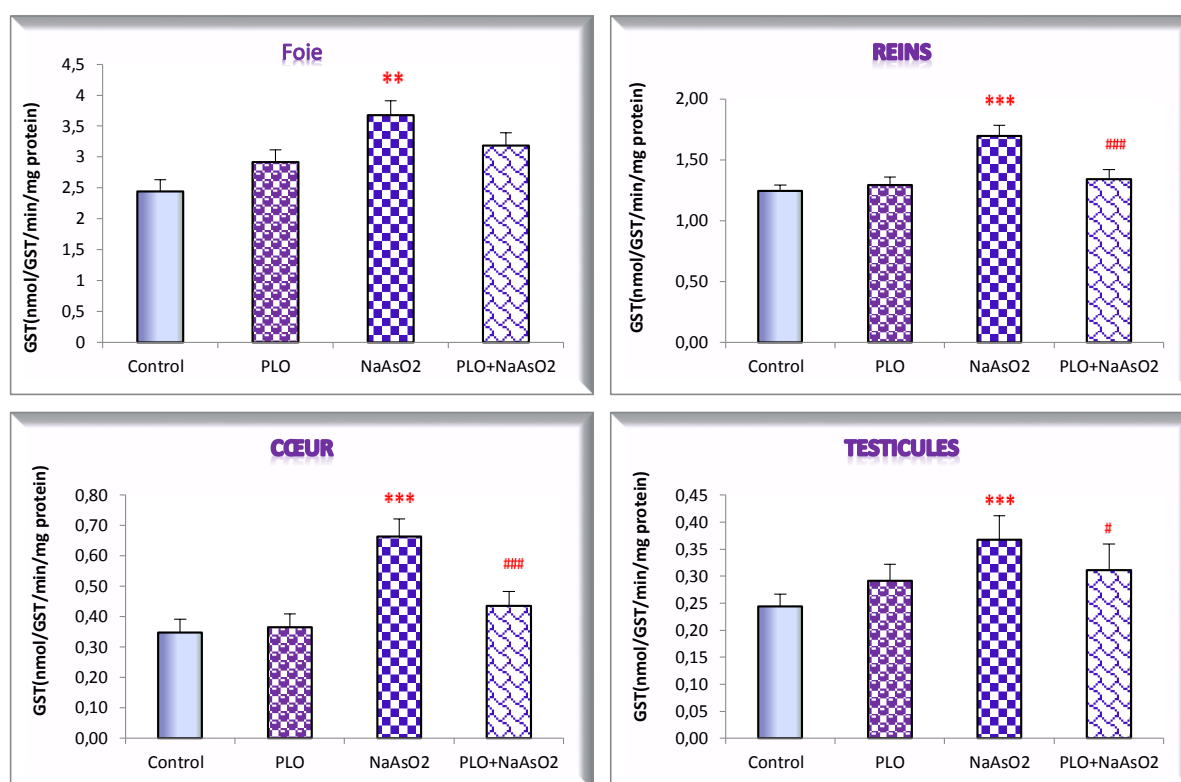
Différence significative comparant au groupe témoin : \*P  $\leq$  0,05 ; \*\*\*p  $\leq$  0,001.

Différence significative comparant au groupe traité par l'arsenic : # p  $\leq$  0,05; ##p  $\leq$  0,01 ; ###p  $\leq$  0,001.

P : Seuil de signification.



**Figure 38.** Variation de l'activité enzymatique de la glutathion peroxydase ( $\mu\text{mol GSH}/\text{mg prot}$ ) dans les organes (foie, reins, cœur et testicules) chez les rats témoins et les rats traités; par PLo, l'arsénite de sodium et par la combinaison (Plo / l'arsénite de sodium).



**Figure 39.** Variation de l'activité enzymatique de la glutathion S-transférase ( $\text{nmol GST}/\text{min}/\text{mg prot}$ ) dans les organes (foie, reins, cœur et testicules) chez les rats témoins et les rats traités; par PLo, l'arsénite de sodium et par la combinaison (Plo / l'arsénite de sodium).

### 5.2.3. La catalase (CAT)

L'étude de l'activité enzymatique de la catalase révèle une diminution significative ( $P \leq 0,05$ ) dans les organes ; foie (- 18.24%), cœur (- 26.66%) et les testicules (- 20.03%), et une diminution hautement significative ( $P \leq 0,01$ ) dans les reins (- 13.62%) chez les rats traités par l'arsénite de sodium comparativement aux rats témoins. En revanche, la comparaison entre le groupe traité par (P<sub>Lo</sub> + NaAsO<sub>2</sub>) et le groupe traité par l'arsenic montre une différence significative ( $P \leq 0,05$ ) de la CAT uniquement dans le foie et aucune variation significative dans les autres organes.

### 5.2.4. La superoxyde dismutase (SOD)

Le traitement des rats par l'arsénite de sodium provoque une diminution hautement significative ( $P \leq 0,01$ ) de l'activité enzymatique de la SOD dans le ; foie (- 21.53%), cœur (- 9.45%) et une diminution très hautement significative ( $P \leq 0,001$ ) dans les testicules (- 18.26%) et significative ( $P \leq 0,05$ ) dans les reins (- 23.86%), par rapport aux rats témoins. En revanche, le pré/co-traitement de P<sub>Lo</sub> avec l'arsenic augmente significativement l'activité enzymatique de la SOD dans les organes ; foie, reins et testicules, en comparant les groupes traités par l'arsenic et par la combinaison (P<sub>Lo</sub>+NaAsO<sub>2</sub>).

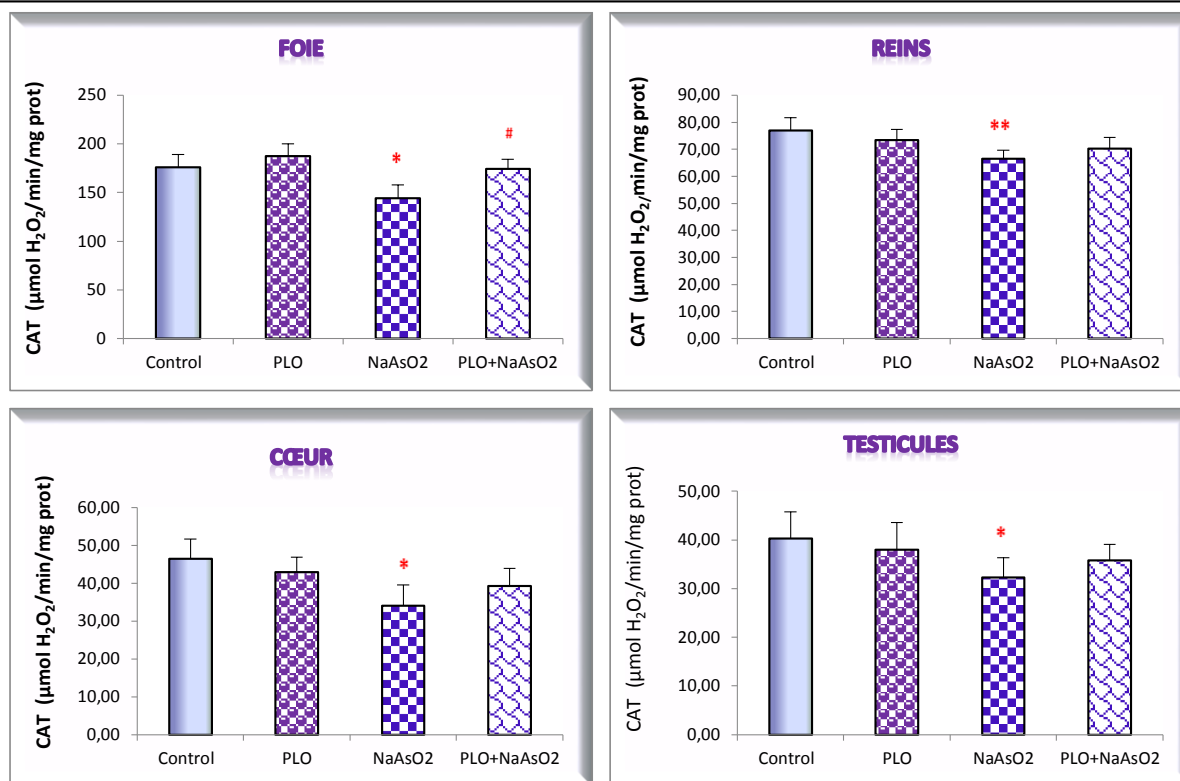
**Tableau 18.** Activité enzymatique de CAT ( $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{min}/\text{mg prot}$ ) et de la SOD ( $\text{U}/\text{mg protein}$ ) Dans les organes (Foie, reins, cœur et testicules) chez les rats témoins et les rats traités; par PLo, l'arsénite de sodium et par la combinaison (PLo /l'arsénite de sodium).

Paramètres	Les organes	Les lots expérimentaux			
		Témoin	NaAsO <sub>2</sub>	PLO + NaAsO <sub>2</sub>	PLO
CAT ( $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{min}/\text{mg prot}$ )	<i>Foie</i>	176,12 $\pm$ 13,14	143,99 $\pm$ 13,95*	174,05 $\pm$ 10,35#	187,33 $\pm$ 12,71
	%	—	- 18,24%	- 1,17%	+6,36%
	<i>Reins</i>	76,90 $\pm$ 4,81	66,42 $\pm$ 3,23**	70,2 $\pm$ 4,29	73,37 $\pm$ 4,05
	%	—	- 13,62%	- 8,71%	- 4,59%
	<i>Cœur</i>	46,46 $\pm$ 5,24	34,07 $\pm$ 5,42*	39,23 $\pm$ 4,68	42,92 $\pm$ 3,92
	%	—	- 26,66%	- 15,56%	- 7,61%
	<i>Testicules</i>	40,33 $\pm$ 5,48	32,25 $\pm$ 4,11*	35,76 $\pm$ 3,26	38,03 $\pm$ 5,50
		—	- 20,03%	- 11,33%	- 5,70%
SOD ( $\text{U}/\text{mg protein}$ )	<i>Foie</i>	318,74 $\pm$ 15,82	250,11 $\pm$ 16,29**	296,41 $\pm$ 13,46*,#	334,43 $\pm$ 16,70
	%	—	- 21,53%	- 7,00%	+4,92%
	<i>Reins</i>	135,17 $\pm$ 4,81	102,91 $\pm$ 3,23*	128,2 $\pm$ 4,29##	131,94 $\pm$ 4,05
	%	—	- 23,86%	- 5,15%	- 2,38%
	<i>Cœur</i>	159,65 $\pm$ 5,20	144,55 $\pm$ 5,17**	146,28 $\pm$ 7,61*	154,8 $\pm$ 6,65
	%	—	- 9,45%	- 8,37%	- 3,03%
	<i>Testicules</i>	148,34 $\pm$ 5,59	121,24 $\pm$ 5,22***	137,54 $\pm$ 0,048*,###	153,91 $\pm$ 4,67
			- 18,26%	- 7,27%	+ 3,75%

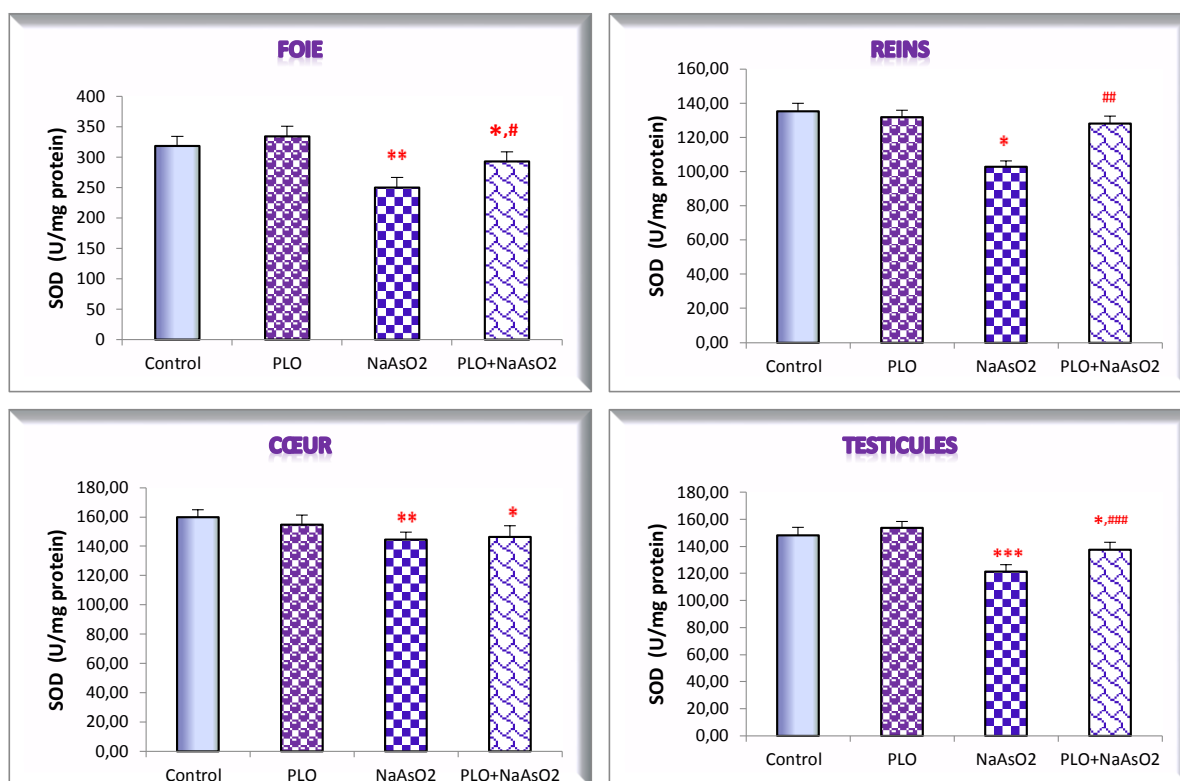
Différence significative comparant au groupe témoin : \*P  $\leq$  0,05 ; \*\*\*p $\leq$  0,001.

Différence significative comparant au groupe traité par l'arsenic : # p $\leq$  0,05; ##p $\leq$  0,01 ; ###p $\leq$  0,001.

P : Seuil de signification.



**Figure 40.** Variation de l'activité enzymatique de la catalase ( $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{min}/\text{mg prot}$ ) dans les organes (foie, reins, cœur et testicules) chez les rats témoins et les rats traités; par PLO, l'arsénite de sodium et par la combinaison (PLO / l'arsénite de sodium).



**Figure 41.** Variation de l'activité enzymatique de la superoxyde dismutase (U/mg prot) dans les organes (foie, reins, cœur et testicules) chez les rats témoins et les rats traités; par PLO, l'arsénite de sodium et par la combinaison (PLO / l'arsénite de sodium).



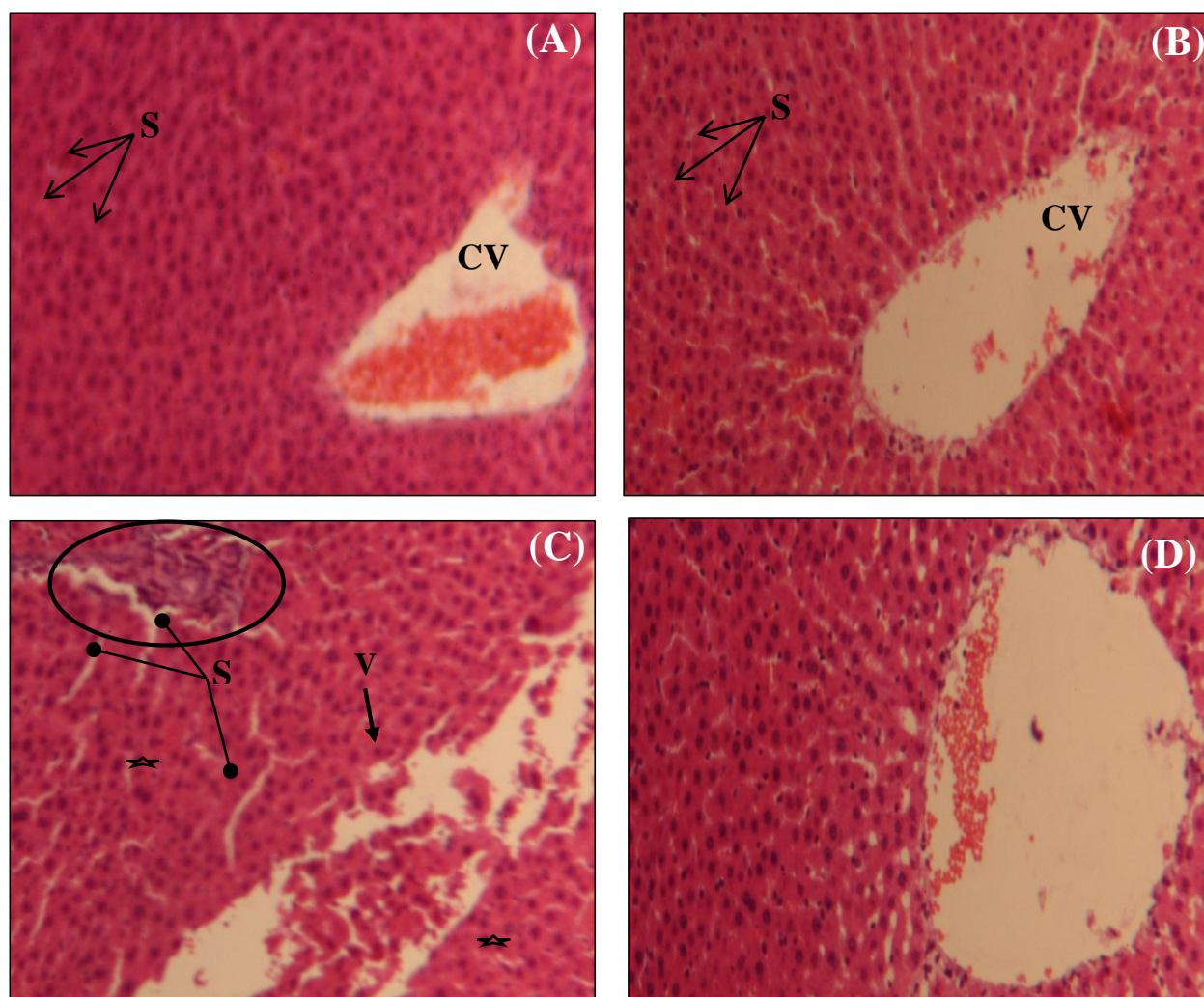
## 6. Etude histologique

### 6.1. Le foie

L'histoarchitecture de foie de groupe témoin révèle une structure histologique régulière avec des lobules hexagonaux (Fig. 42 A), aucune modification histologique n'a été observée dans le foie de groupe traité par PLo (Fig. 42 B) par rapport au témoin. En revanche, le foie de groupe traité par l'As illustre des altérations pathologiques tels que ; la dilatation et la congestion vasculaire dans les sinusoides, infiltration de cellules mononucléaires et une nécrose cellulaire (Fig. 42 C). Tandis que, l'observation microscopique du foie des rats traités par combinaison de PLo/As a montré une structure similaire à celle de témoin (Fig. 42 D).

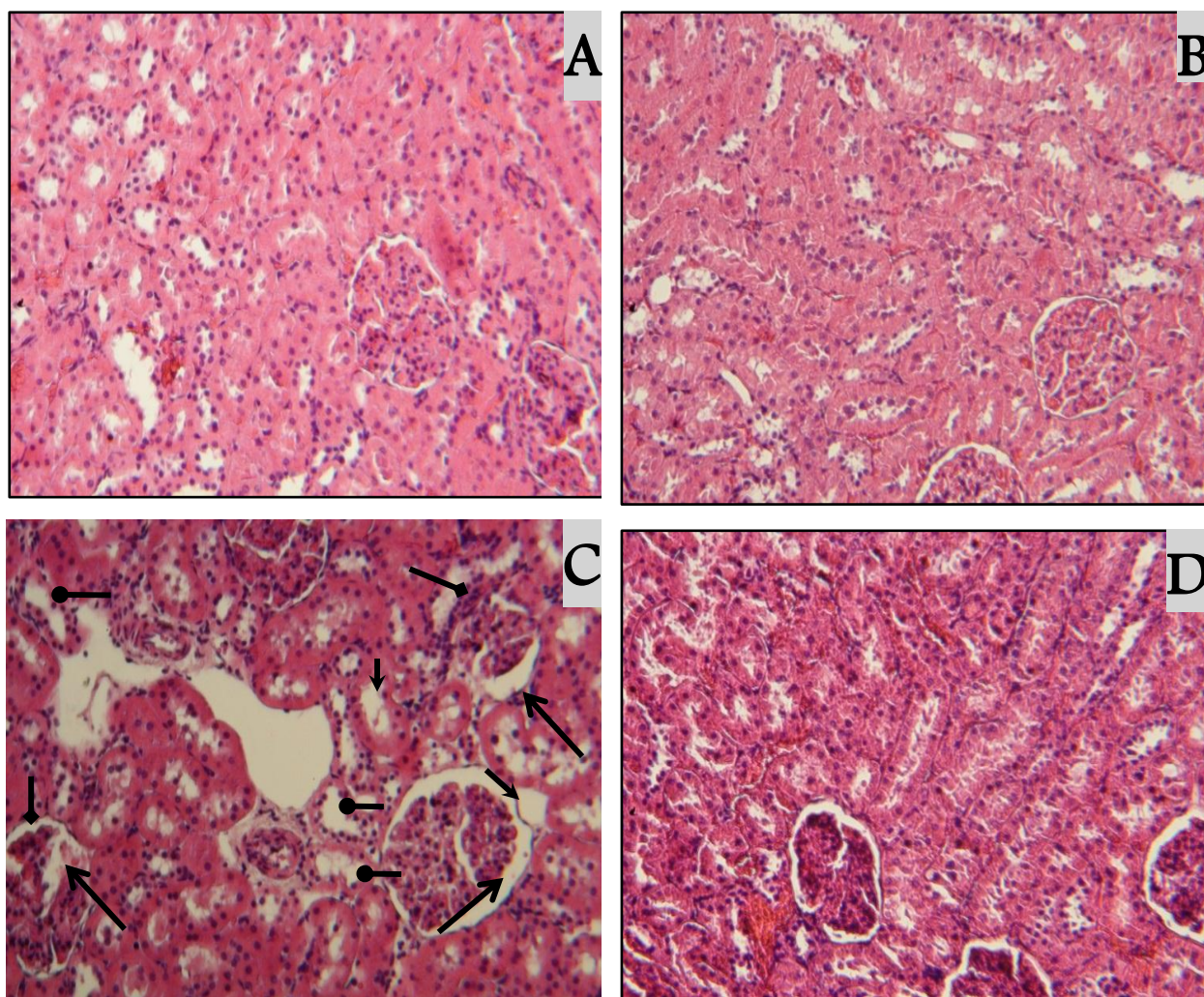
### 6.2. Le rein

Les observations microscopiques du rein d'un rat témoin et traité par PLo seul ont montré un parenchyme rénal normal avec des glomérules et des tubules rénaux bien définis (Fig. 43 A, B). Par contre, une hémorragie intra-glomérules, dilatation tubulaire et une dégénérescence des glomérules rénaux ont été clairement observé dans le rein traité par l'arsenic (Fig. 43 D). Par ailleurs, ces altérations histologiques ont été visiblement réduites par la supplémentation de l'huile de *Pistacia lentiscus* chez le groupe traité par la combinaison (PLo/As) (Fig. 43 C).



**Figure 42.** Les coupes histologiques du foie de rat témoin (A) et traités par PLo (B), l'As (C) et par la combinaison (PLo/As) colorées à Hématéine-Eosine 100 X.

CV; veine centrale, S; espace sinusoïdale, V; vacuolisation, —● Dilatation des sinusoïdes, ○ Infiltration des cellules mononucléaires, ★ ; nécrose cellulaire.



**Figure 43.** Coupes histologiques des reins colorées à Hématéine-Eosine: (A) rat témoin, (B) traité par PLo, (C) traité par l'As et (D) traité par la combinaison PLo/As (H & E 100X).

—●; Dilatation tubulaire, —◆; Hémorragie intra-glomérules, →; Vacuolisation, —→; Dégénérescence de glomérule.





## CHAPITRE IV : DISCUSSION

#### IV. Discussion

Notre étude est réalisée avec une concentration de 5,55 mg/kg poids corporel d'arsénite de sodium, une dose de 3 mg/kg du sélénite de sodium et une dose de 3,3 ml/Kg de l'huile de *Pistacia lentiscus* en se référant respectivement aux travaux effectués par (Pal et Chatterjee, 2004), (Biswas et al., 1999; Chattopadhyay et al., 2003) et (Djerrou et al., 2010, 2011 ; Boukeloua et al., 2012 ; Djerrou, 2014).

##### **1. Evaluation des effets cytotoxiques de l'arsenic chez les rats Wistar : Effets sur certains facteurs de croissance et sur la variation des paramètres hématologiques, biochimiques, histopathologie et du profil du stress oxydant.**

Les résultats de notre expérimentation suggèrent que l'administration de l'arsénite de sodium comme un agent stressant, que ce soit dans la première et/ou dans la deuxième expérimentation fait diminuer la croissance corporelle par rapport à celle des témoins.

En ce qui concerne les effets sur le poids relatif des organes étudiés, nous avons remarqué une augmentation de poids relatif des organes surtout dans le foie et les reins chez les rats traités par l'arsenic. Cette augmentation de poids relatif peut être due à l'accumulation de l'arsenic dans les organes étudiés ; où il peut agir avec les groupements thiols (-SH) des protéines hépatiques, rénales, cardiaques et testiculaires (Aposhian et Aposhian, 1989 ; Styblo et Thomas, 1997). Ceci est confirmé par les travaux d'El-Demerdash et al. (2009) qui ont montré que l'administration de l'arsénite de sodium à 5 mg/kg pendant 30 jours a augmenté les poids relatif des organes (foie, reins) et a diminuée la croissance corporelle des rats.

L'analyse de nos résultats a montrée aussi que le traitement des rats par l'arsénite de sodium, a provoqué une diminution importante des globules rouges, d'hémoglobine, d'hématocrite et de VGM et aucune différence significative des CCMH, TGMH. D'après ces résultats, on peut constater que ce composé toxique a provoqué une anémie (chute du taux du GR, Hb et d'HCT) de type microcytaire (VGM modifié).

Cette anémie microcytaire est due d'une part ; aux effets des radicaux libres générés par l'arsenic sur les globules rouges, où certains radicaux libres comme ;  $O_2^-$  et  $\cdot OH$  sont des espèces très réactives capables de provoquer des dommages cellulaires par le biais de la peroxydation des lipides membranaires. De plus, en présence de fortes concentrations de ces radicaux, l'hémoglobine peut facilement s'oxyder (Gurer et al., 1998 ; Hughes, 2002 ; Modi et al., 2006). D'autre part, l'activité de l'ALAD (l'acide  $\delta$ -aminolévulinique déshydratase l'enzyme clé qui catalyse la 2<sup>ème</sup> étape de la biosynthèse de l'hème) (Emmanuelli et al., 1998) est très sensible aux effets toxiques de l'arsenic, ALAD possède des groupements sulfhydriles qui sont les cibles privilégiées de l'arsenic, dénaturant ou inhibant ainsi la fonction de l'ALAD (Ahmad et al., 2002).

L'inhibition de l'activité de l'ALAD et la réduction de l'hémoglobine et les GR conduisent à une diminution de la synthèse de l'hème et finalement l'anémie. Ces résultats sont en accord avec les études (Kalia et al., 2006 ; Modi et al., 2006).

Tandon et ses collaborateurs. (1993), ont confirmé aussi que les métaux lourds comme l'arsenic, le nickel, le plomb et le cadmium peuvent altérer de nombreux paramètres hématologiques notamment les globules rouges et hémoglobine.

L'administration de l'arsénite de sodium a entraîné une perturbation au niveau des paramètres biochimiques. Cette perturbation se traduit par :

➤ La diminution importante des protéines totales et d'albumine plasmatiques, L'effet de l'arsenic sur le profil protéique on peut l'expliquer par le fait que la plupart des protéines possèdent des groupements (SH, OH), ces dernières réagissent très facilement avec l'arsenic et les radicaux libres générés par ce métalloïde et par conséquent ces protéines peuvent se dénaturer et se fragmenter, ou perdre leurs structures primaires et secondaires (Aposhian et Aposhian, 1989). L'effet inhibiteur de l'arsenic sur le profil protéique est en accord avec l'étude de Nandi et al. (2005) qui ont montré que l'arsenic inhibe les glucocorticoïdes, qui jouent un rôle important dans la synthèse et/ou le métabolisme des protéines. Donc, la réduction des

protéines plasmatiques chez les animaux exposés à des polluants environnementaux (As) pourrait être attribuée à la modification de la synthèse des protéines et le métabolisme des acides aminés au niveau du foie (El-Demerdash et al., 2009).

➤ L'augmentation de l'activité enzymatique des (ASAT, ALAT) et la phosphatase alcaline (PAL), qui sont des biomarqueurs de la fonction hépatique (Klaassen et Watkin, 1984 ; Ronald et Koretz, 1992) est liée à l'effet hépatotoxique de l'arsenic (Liu et al., 2000), où l'accumulation de l'arsenic et les métabolites toxiques de la peroxydation lipidique (MAD, 4-HNE) provoque une lésion des cellules hépatiques qui déversent leurs contenu tels que les transaminases et la phosphatase alcaline dans le sang (Youssef et al., 2008). La lésion cellulaire et l'altération hépatique sont clairement révélées au niveau des coupes histologiques (Voir figs. 28 et 42).

➤ L'augmentation du taux sériques en urée, en créatinine et en acide urique qui, sont considérés comme des biomarqueurs de la dysfonction rénale, la filtration glomérulaire et les dommages rénaux provoqués par l'arsenic (Finco, 1997). En effet, l'augmentation de l'urée dans le sérum est corrélée avec l'augmentation de catabolisme protéique, les protéines peuvent être dégradées en acides aminés puis en urée (l'urée est le produit final de dégradation des protéines). Ceci est confirmé par la diminution des protéines totales dans le sérum. Donc l'augmentation de l'urée, créatinine et l'acide urique chez les rats traités par l'As est due à l'effet néphrotoxique de l'arsenic (Nandi et al., 2006 ; El-Demerdash et al., 2009). Ces résultats sont confirmés par les altérations rénales provoquées par l'arsenic au niveau des coupes histologiques (Voir fig. 43).

➤ Une augmentation significative en glucose. Cette hyperglycémie est probablement due aux effets du stress oxydant induit par l'arsenic. En effet, le stress oxydatif est responsable d'une multitude de dysfonctions métaboliques comme la résistance à l'insuline (Santure et al., 2002). L'état de résistance à l'insuline est caractérisé par la diminution de la réponse à l'insuline dans les cellules insulinosensibles. L'insulinorésistance entraîne une élévation des taux circulants d'insuline et une intolérance au glucose et une diminution de la stimulation du captage

du glucose par l'insuline. Ce qui inhibe la pénétration du glucose dans les tissus (Baudler et al., 2003).

➤ La bilirubine est un produit terminal de la dégradation de l'hème résultant du catabolisme de l'hémoglobine. Par ailleurs, la diminution de la bilirubine totale chez les rats traités par l'arsenic dans la première expérimentation, peut être due à l'effet antioxydant de la bilirubine. La bilirubine est un piègeur d'oxygène singulet et de radicaux peroxydes  $RO_2\cdot$  et protège ainsi l'albumine et les acides gras qui y sont associés des attaques radicalaires (Thérond et al. 2005).

L'arsenic est connu pour induire la production des espèces réactives de l'oxygène et les radicaux libres : peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) (Barchowsky et al., 1996 ; Chen et al., 1998), radicaux hydroxylés ( $HO\cdot$ ) (Wang et al., 1996), oxyde nitrique ( $NO\cdot$ ) (Gurr et al., 1998), anions superoxydes ( $O_2^{\cdot-}$ ) (Lynn et al., 2000), peroxy diméthylarsinique ( $[(CH_3)_2AsOO\cdot]$ ) et radicaux de diméthylarsinique ( $[(CH_3)_2As\cdot]$ ) (Yamanaka et al., 1997), et donc modifie la balance entre les radicaux libres générés et les systèmes antioxydants, et altérer l'équilibre pro-oxydant/antioxydant, et par conséquence induire le stress oxydant.

L'organisme possède tout un arsenal d'enzymes qui permettent de lutter contre le stress oxydant. Cependant ces enzymes peuvent être affectées par l'arsenic, qui agisse en provoquant la décroissance des activités des enzymes antioxydantes telles que la SOD, la CAT et la GPx. (Ramos et al., 1995). Ainsi il apparaît nécessaire de mesurer les activités de ces enzymes pour évaluer l'impact d'arsenic comme agent inducteur du stress oxydant.

La SOD est une enzyme antioxydante qui prend en charge l'anion superoxyde et le métaboliser en peroxyde d'hydrogène, tandis que la CAT réduit le peroxyde d'hydrogène précédemment produit par la SOD et le métaboliser en eau.

La réduction de l'activité de la SOD chez les rats traités par l'As peut être attribuée à la surproduction de l'anion superoxyde résultant du métabolisme de l'arsenic (Yamanaka et al., 1997 ; Flora, 2011). En outre, l'effet de l'arsenic sur la SOD est également attribué à la modification de l'expression de la SOD, l'épuisement des



antioxydants cellulaires comme ; le GSH et la vitamine E, ou à la modification de l'activité antioxydante en affectant leur structure (oxydation/réduction de groupement thiol et le déplacement de métaux essentiels) (De Vizcaya-Ruiz et al., 2009).

L'augmentation des radicaux superoxydes inhibe également l'activité de la CAT. La réduction de l'activité enzymatique de la catalase indique aussi que l'arsenic affecte la capacité de neutraliser l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par cette enzyme, ce qui conduit par la suite à l'accumulation d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Kono et Fridovich, 1982 ; Irshad et Chaudhuri, 2002). Nos résultats sont en accord avec les travaux de Mohanta et al. (2015).

La GPx est une enzyme clé qui règle le niveau des ROS (la GPx est capable de non seulement de réduire le peroxyde d'hydrogène en eau, mais aussi les hydroperoxydes résultants de l'oxydation des acides gras insaturés) et donc protège les cellules contre les dégâts générés par l'arsenic (Wang et al., 1997 ; Jing et al., 1999). D'après nos résultats on observe une diminution de l'activité de la GPx dans les organes étudiés (foie, reins, testicules ou cœur) chez les rats traités par l'arsénite de sodium. Cette diminution est due principalement à une surproduction de peroxyde d'hydrogène et l'épuisement du sélénium et de GSH dans la détoxification de l'arsenic (Aposhian et al., 1999 ; Shila et al., 2005). En effet, la GPx nécessite la présence du glutathion et du sélénium pour son bon fonctionnement (Nielson, 1995).

Concernant la glutathion S-transférase (GST), cette enzyme joue un rôle important dans la détoxification des xénobiotiques et/ou dans la protection contre des métabolites nocifs générés après la dégradation des macromolécules suite à leur exposition au stress oxydant (Danyelle et Kenneth, 2003). D'après nos résultats on observe une augmentation significative de la GST dans les organes étudiés. Donc la GST est impliquée directement dans la détoxification et l'élimination de l'arsenic et ces métabolites (Kalia et al., 2006).

En parallèle des enzymes antioxydantes, notre organisme possède aussi deux potentiels mécanismes de défense cellulaire non enzymatique contre le stress oxydatif,

qui sont de faibles poids moléculaire et riches en cystéine, connu par les métallothionéines et le GSH.

Dans cette étude, l'épuisement des taux de GSH après le traitement par l'arsenic, pourrait s'expliquer par une réponse adaptative au stress oxydatif, le GSH joue un rôle fondamental dans la détoxification d'arsenic (l'arsenic interagit directement avec une forte affinité aux groupements thiols de GSH). De plus le GSH stimule l'excrétion de composés méthylés de l'arsenic, le glutathion peut aussi interagir avec les radicaux libres générés par ce métalloïde, ou bien peut agir comme un donneur d'électrons pour la conversion de l'arsenic (V) en l'arsenic (III) dans le métabolisme de l'arsenic (Flora et al., 2005 ; Manna et al., 2008).

L'arsenic inhibe la glutathion synthétase, et la glutathion réductase (Bisson, 2002), donc peu de GSH est produit. Tous ces facteurs conduisent à une forte déplétion du glutathion réduit (GSH) et une augmentation du glutathion oxydé (GSSG), et par conséquence une diminution de l'activité des enzymes GSH-dépendantes.

Les métallothionéines (MTs) sont des protéines de faible poids moléculaire et ont une exceptionnelle richesse en résidus de cystéine. Les MTs jouent un rôle dans l'homéostasie des métaux essentiels tels que le zinc et le cuivre, la détoxification des métaux lourds tels que le Cd et la protection contre les différents stress physiques et chimiques (Kagi et Vallee, 1960; Geret et al., 2002; Achard-Joris, 2005).

La déplétion de la teneur cellulaire en métallothionéines chez les rats recevant l'arsénite de sodium est probablement dû à la forte teneur des métallothionéines en cystéine (21 groupements SH par molécule de MTs), ce qui leur confère un fort pouvoir complexant vis-à-vis de certains atomes métalliques pour former un complexe métal-métallothionéine inactif. Les MTs peuvent aussi réagir avec les EROs, notamment les radicaux hydroxyles et superoxydes (Viarengo et al., 1999 ; McAleer et Tuan, 2001).

La très forte affinité mutuelle des métaux et/ou des EROs pour les métallothionéines offre ainsi une certaine protection cellulaire (Bell et Vallée, 2009; Klaassen et al., 2009). En effet, les MTs agissent comme des agents de séquestration des métaux toxiques afin d'empêcher leur fixation sur les sites actifs d'autres protéines provoquant alors leur dénaturation ou leur inactivation.

L'effet de l'arsenic sur le GSH, les métallothionéines et les activités des enzymes antioxydantes s'accompagne d'une augmentation de la quantité de radicaux libres comme le radical hydroxyle qui à leur tour peut initier la peroxydation lipidique (Valko et al., 2006; Hansen et al., 2006). Ce qui est en accord avec les résultats de notre expérimentation, où une augmentation du taux de malondialdéhyde (MDA) qui est un biomarqueur de la peroxydation lipidique (Favier, 1997 ; Bonnefont-Rousselot et al., 2003) a été observée au niveau des organes étudiés.

Nos constatations sont en accord avec celles de Mohanta et al. (2015) démontrant l'altération du statut pro/antioxydant des rats traités par l'arsenic. Cette altération est marquée par : l'augmentation de la peroxydation lipidique, une diminution du taux de GSH cellulaire et une baisse de l'activité enzymatique de la SOD, de la CAT et de la GPx.

L'augmentation de la peroxydation lipidique (MDA, 4-HNE), la déplétion du GSH, l'augmentation des radicaux libres et la diminution de l'activité enzymatique de la SOD, de la CAT et de la GPx sont des facteurs responsables des lésions tissulaires importantes. Ce qui confirme nos observations histologiques de foie et des reins (Allen et Rana, 2007 ; Mershiba et al., 2013) (voir fig. 28, 42 et 43).

Au niveau de foie les altérations histologiques sont indiquées par des cytolyses et une dilatation des sinusoides bien visibles chez les lots traités par l'arsenic par rapport au lot témoin. Les modifications biochimiques (l'augmentation des transaminases, la phosphatase alcaline et la diminution des protéines et d'albumine) confirment également les données histologiques observées au niveau du foie des rats recevant l'arsenic.

L'histoarchitecture rénale des rats recevant l'arsenic présente; une dilatation tubulaire, hémorragie intra-glomérule et une dégénérescence de glomérule rénale. Ces altérations sont probablement dues aux effets néfastes des radicaux libres et les produits finaux issus de la peroxydation lipidique (MDA, 4-HNE) induite par l'arsenic. De ce fait, l'accumulation des hydroperoxydes dans les reins est l'un des facteurs cytotoxique et nécrotique associés à la peroxydation des phospholipides membranaires (Li et al., 2010 ; Mershiba et al., 2013). Ces résultats confirment les

modifications observées lors des mesures des paramètres biochimiques et les biomarqueurs d'atteinte rénale (urée, acide urique et la créatinine) d'une part, et confirment également la grande implication des cellules tubulaires rénales dans l'excrétion de l'arsenic et ces métabolites qui les rend par la suite plus susceptibles d'être endommagés. Ces résultats sont en accord avec les données préalablement publiés de (Saxena et al., 2009 ; Mershiba et al., 2013).

## 2. L'étude de l'effet cytoprotecteur et la capacité anti-oxydante du sélénium contre les effets nocifs de l'arsenic chez les rats

Dans la première expérimentation la co-administration du sélénium avec l'arsenic chez le groupe traité par la combinaison (l'arsénite de sodium/sélénite de sodium) a rétabli la prise pondérale et les poids relatif des organes (foie, reins), a corrigée l'anémie microcytaire provoquée par l'arsenic, a atténué partiellement les effets cytotoxiques de l'arsenic sur les paramètres biochimiques tel que ; l'activité enzymatique des transaminases et la phosphatase alcaline d'une part, et les protéines, l'albumine et le glucose d'autre part. Et a entraîné une amélioration importante dans les paramètres du stress oxydatif, où le taux de glutathion, les activités enzymatiques de la GPx, de la GST et le taux du MDA dans les organes (foie, reins, testicules) reviennent presque à la normale.

L'ensemble de ces résultats montrent que le sélénium a un effet protecteur contre la cytotoxicité de l'arsenic et protège le foie ainsi que les organes cibles de l'accumulation de l'arsenic (Levander, 1977 ; Biswas et al., 1999).

Des données bibliographiques (Levander, 1977 ; Aposhian et al., 1999) ont montré que l'administration du sélénite de sodium chez les rats traités par l'arsénite de sodium prévenait le foie, les reins ainsi que les testicules de l'accumulation de l'arsenic et allégeait ces effets nocifs, tout en augmentant l'excrétion biliaire et réduisant les concentrations tissulaires en arsénite.

Ghosh et al. (1994) et Ersoz et al. (2003), ont démontré que l'administration du sélénite de sodium chez les souris et les rats diabétiques restaure également ; le taux de glucose dans le plasma, le contenu du glycogène hépatique et renforce la sécrétion de l'insuline, ce qui confirme l'effet hypoglycémiant du sélénium.

Le sélénium joue un rôle de cofacteur biologique de certains enzymes antioxydantes, notamment la glutathion peroxydase et la thioredoxine réductase, deux enzymes précieuses pour protéger l'organisme contre l'oxydation par les radicaux libres, où l'activité de ces enzymes est très dépendante de l'apport nutritionnel en sélénium (Mckenzie et al., 2002 ; Favier, 2003 ; Thérond et Denis, 2005 ).

Dolezych et Szulinska, (2003) ont indiqué que la supplémentation en sélénium chez les souris exposés au stress oxydant généré par l’ozone O<sub>3</sub>, pourrait réduire le déséquilibre pro-oxydant/antioxydant, en augmentant l’activité enzymatique de la GPx et le taux du glutathion réduit.

Thiorédoxine réductase (TrxR) des mammifères sont des réductases contenant du sélénium, elle dépend sur un résidu sélénocystéine pour la réduction du disulfure au niveau de site actif des thiorédoxines (Arner, 2009).

Une étude récente (Xu et al., 2013), réalisée pour évaluer les effets du sélénium sur les dommages oxydatifs au niveau du foie et l'expression de certains gènes (Txnrd1 et HSP) après une exposition chronique à l'arsenic chez le rat, a montré une diminution significative de l’activité enzymatique de la thiorédoxine réductase et une réduction importante au niveau de l'ARNm (Txnrd1) chez les rats recevant l’arsenic, tandis que la supplémentation en sélénium a rétabli ce changement. Par ceci, Ils sont suggérés que les agressions oxydatives causées par l'exposition à l’arsenic, sont attribuées à la répression génique de la thiorédoxine réductase, et que la supplémentation en sélénium peut réduire le stress oxydatif par l'augmentation de l’activité de la TrxR. ce qui explique le rôle pivot du sélénium dans le contrôle de l’expression génique.

De plus, l’arsenic et le sélénium ce sont des métalloïdes possédants des propriétés chimiques semblables, mais avec des effets biologiques différents (Zeng et al., 2005), Le sélénium est capable d’interagir directement avec l’arsenic, offrant ainsi une certaine protection contre la toxicité de l’arsenic ( Levander, 1977 ; Zeng et al., 2005). D’autres études (Kenyon et al., 1997; Aposhian et al., 1999) ont montré l’augmentation de l’excrétion biliaire de l’arsenic après l’administration du sélénite de sodium chez les rats.

Plus récemment, il a été démontré *in vivo* que l’antagonisme entre l’arsenic et le sélénium est basé sur la formation d’un nouveau composé biologiquement inactif et insoluble dans le foie, le composé As-Se : séléno-bis S-glutathionyl arsénium [(GS)<sub>2</sub> 2As Se] qui est excrété par la suite dans la bile (Gailer et al., 2002 ; Gailer, 2009 ).

Enfin, nous pouvons imaginer que le mécanisme d'action protecteur du sélénium est représenté par l'augmentation de l'excrétion biliaire de l'arsenic, l'activation des enzymes séléno-dépendante et la régénération de GSH entraînant ainsi une diminution des radicaux libres et la peroxydation lipidique.

### 3. Etude de la capacité préventive et cytoprotectrice de l'huile de *Pistacia lentiscus* sur la cytotoxicité de l'arsenic chez les rats

La deuxième expérimentation est focalisée sur l'étude d'éventuels effets préventifs et antioxydants de l'huile de *Pistacia lentiscus* contre la cytotoxicité induite par l'arsenic chez les rats afin d'atténuer les endommagements cellulaires au niveau des oranges étudiés.

Dans un premier temps, nous avons déterminé divers indices physico-chimiques, qui sont intéressants en termes d'évaluation de la qualité des huiles végétales. Les propriétés physico-chimiques de l'huile de *Pistacia lentisque*, sont indiquées dans le tableau 12.

La densité ou masse volumique dépend de la température et de la composition chimique de l'huile. Elle nous renseigne sur la nature de la composition en acide gras, notamment de la longueur de la chaîne, de la présence d'insaturation et de fonctionnalité sur la chaîne carbonée.

La valeur de la densité mesurée de notre huile est de  $0,918 \pm 0,02$ . Cette valeur est de même ordre que celles trouvée par Djerrou, (2014) ( $0.919 \pm 0.01$ ) et par Boukeloua et al. (2012) ( $0,918 \pm 0,02$ ).

L'indice de réfraction dépend, comme la densité, de la composition de l'huile et de la température. Il croît avec l'insaturation et la présence sur les chaînes grasses de fonctions secondaires. L'indice de réfraction mesuré pour notre huile est de 1,4691. Cette valeur est proche de celle reportée par Djerrou, (2014) pour l'huile de lentisque ( $1.466 \pm 0.02$ ) et celles reportées par Karleskind (1992), concernant les huiles d'olive, de palme et d'avocat, qui sont respectivement (1,468-1,470), (1,453-1,458) et (1,464-1,474).

Donc l'indice de réfraction et la densité sont dans la gamme par rapport aux autres huiles végétales.



L'indice d'acide ou l'acidité nous renseigne sur le taux d'acides gras libres existant dans l'huile. La valeur d'acidité trouvée est de  $2.955 \pm 0.03$ . Cette valeur est légèrement inférieure à celle rapportée par Charef et al. (2008), qui ont attribué la valeur d'acidité élevée de leurs échantillons, à la mauvaise conservation des fruits avant l'extraction et l'analyse et à la maturité incomplète des graines.

La valeur de l'indice de saponification de l'huile de lentisque est de 198,25 à 200.75 ( $n=3$ ). Cette valeur est proche de celle reportée par Djerrou, (2014) ( $191,07 \pm 0,2$ ), ce qui montre également que l'huile de lentisque a un indice de saponification élevé.

L'indice de peroxyde est la mesure de la stabilité contre l'oxydation en présence d'une température élevée, la lumière et l'oxygène. Notre huile présente un acceptable indice de peroxyde (2.1 à 2.3), ce qui signifie une faible tendance à s'oxyder, et une bonne stabilité contre l'oxydation. L'indice de peroxyde des huiles raffinées, peut aller jusqu'à 10 mEq d'oxygène actif/kg d'huile et peut augmenter jusqu'à 15 mEq d'oxygène actif/kg pour les huiles vierges et pressées à froid (CODEX STAN, 2001).

Dans un second temps, d'après les résultats obtenus dans la deuxième expérimentation, on peut dire que le pré/co-traitement d'huile de *Pistacia lentiscus* avec l'arsenic a fourni une protection significative ; aux paramètres hématologiques, biochimiques et les marqueurs du stress oxydatif qui ont été altérés en présence d'arsenic.

L'effet protecteur de l'huile de *Pistacia lentiscus* est probablement dû à sa richesse en composés bénéfiques qui ont un pouvoir antioxydant puissant, ces composés jouent certainement un rôle important *in vivo*, en particulier ; les acides gras insaturés et saturés tels que l'acide oléique, l'acide palmitoléique, l'acide linoléique, l'acide palmitique et l'acide stéarique, (Charef et al., 2008 ; Trabelsi et al., 2012; Dhifi et al., 2013; Djerrou, 20014), les polyphénols compris les flavonoïdes et les tanins (Bhourri et al., 2010),  $\alpha$ -tocopherol (Kivçak et Akay, 2005; Dhifi et al., 2013), les stérols et les terpènes (Gardeli et al., 2008).

PLo est riche en acides gras mono-insaturés et les acides gras essentiels tels que l'acide oléique et l'acide linoléique (Djerrou, 20014), qui ont une action protectrice contre les altérations biochimiques et moléculaires induites par l'arsenic à travers leur propriété de piégeage des radicaux libres et la réduction de la peroxydation lipidique (Sahaand Ghosh, 2009, 2010).

L'huile de *Pistacia lentiscus* contient une quantité importante de tocophérols (8111,137 mg de tocophérols/kg de l'huile), particulièrement  $\alpha$ -tocophérol (Dhifi et al., 2013). Les effets protecteurs de la vitamine E émergent directement à partir de ses propriétés antioxydantes; l' $\alpha$ -tocophérol est connue par leur activité antiradicalaire très puissante, intervient au niveau des membranes lipidiques et dans les lipoprotéines circulantes où elle réagit majoritairement avec les radicaux peroxydes en formant un radical tocophéryle (Weber et al., 1997; Weijl et al., 1997). Cette vitamine a montré une capacité protectrice importante contre l'intoxication induite par l'arsenic, où elle peut réagir directement avec des radicaux méthylés de l'arsenic, en réduisant ainsi l'accumulation de l'arsenic et la déplétion du sélénium (Mohanta et al., 2015). Mittal et Flore, (2007) ont montré que le traitement par la vitamine E a corrigé les perturbations des paramètres de la voie de synthèse de l'hème, le stress oxydatif induit dans le foie et les reins et la concentration des métaux essentiels dans le sang et les tissus des souris mâles intoxiqué par arsenic.

Les fruits de *Pistacia lentiscus* se caractérisent par la présence des flavonols et les dérivés de galloyl, y compris galloyl-glucosides, les ellagitanins, acides galloyl-quinique, gallique et de l'acide digalliques (Romani et al., 2002 ; Gardeli et al., 2008 ; Bhourri et al., 2010). Ces composés principalement l'acide gallique et l'acide digalliques sont très riches en groupements hydroxyles qui sont capable de stabiliser les espèces réactives de l'oxygène.

Une étude (Bhourri et al., 2010) réalisée sur la lignée cellulaire K562 (Human chronic myelogenous leukaemia, cell line K562) a démontré que l'acide digallique isolé à partir de *Pistacia lentiscus* a un effet antigénotoxique considérable. De plus, cette étude a affirmé que l'acide digalliques de *Pistacia lentiscus* est capable de réagir et de neutraliser les électrophiles et réduire la peroxydation lipidique provoquée par  $H_2O_2$ .

Plusieurs terpènes ont été examinés pour évaluer leurs activités antioxydantes et ces propriétés biologiques. En effet, l'acide ursolique et de son isomère l'acide oléanolique, sont des triterpènes bioactifs les plus connus qui constituent la résine de *Pistacia lentiscus* (Assimopoulou et al., 2005). Les deux acides (ursolique et oléanolique) ont montré une grande efficacité contre les lésions hépatiques induite chimiquement chez les animaux de laboratoire, ils présentent aussi des propriétés ; anti-inflammatoires, anti-hyperlipidémique et ont des effets anti-tumorale. Et comme sont non toxiques, ils ont été utilisés dans des produits cosmétiques, des produits de santé et ont été également proposés pour la prévention du cancer de la peau (Liu, 1995; Rios et al., 2000).

Il est important de noter que la résine de *Pistacia lentiscus* améliore la défense cellulaire contre le stress oxydatif par les voies physiologiques, éventuellement par la restauration de GSH et la régulation négative des récepteurs CD36 des cellules mononucléaires du sang périphérique (Dedoussis et al., 2004).

D'après nos résultats, la supplémentation de l'PLO allégeait aussi les altérations histologiques (foie, reins) induite par l'arsenic, cette amélioration pourrait être attribuée à la richesse de cette l'huile en composés bénéfiques qui ont un pouvoir antioxydant puissant et qui sont capables de réduire de manière significative le stress oxydatif, et par la suite conduit à la réduction des modifications histopathologiques et la restauration de l'état physiologique normal de l'organisme.

Ainsi, les composés de l'huile de *Pistacia lentiscus* agissent par plusieurs mécanismes; (i) en améliorant la séquestration et l'inactivation des radicaux libres; (ii) par chélation avec des métaux rédox; (iii) et en réduisant la peroxydation lipidique par l'intermédiaire de l'induction des antioxydants enzymatiques et non enzymatiques tels que : SOD, CAT, GPx, GSH et MT.



## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

## **Conclusion générale et perspectives**

En conclusion, nos résultats montrent dans un premier temps que l'administration de l'arsénite de sodium, que ce soit dans la première et/ou dans la deuxième expérimentation à 5,55 mg/kg de poids corporel par injection intrapéritonéale chez les rats mâles adultes pendant 21 jours, a provoqué des perturbations dans la plupart des paramètres étudiés.

En ce qui concerne la croissance corporelle, nos résultats ont montré :

- Une diminution du poids corporel durant la période de traitement ;
- Une augmentation de poids relatif des organes étudiés (Foie, reins, testicules ou cœur).

À propos de l'étude des paramètres hématologiques, l'administration de l'arsénite de sodium, a provoqué :

- Une diminution du nombre de globules rouges et l'hémoglobine;
- Une diminution d'hématocrite et du volume globulaire moyen témoignant de l'installation d'une anémie de type microcytaire.

Le traitement par l'arsénite de sodium a induit des perturbations au niveau des paramètres biochimiques et les biomarqueurs hépatiques, rénales et métaboliques ce qui confirme l'effet hépatotoxique et néphrotoxique de l'arsenic.

En ce qui concerne l'étude de quelques paramètres du stress oxydatif, nos résultats ont montré aussi que l'arsenic a un effet pro-oxydant, capable de perturber le système antioxydant par :

- L'augmentation de la peroxydation lipidique au niveau des organes étudiés ;
- La diminution du taux de glutathion réduit et les métallothionéines ;
- La diminution de l'activité enzymatique de la glutathion peroxydase, la catalase et la superoxyde dismutase au niveau des organes étudiés.

L'étude histologique des organes (foie et reins) révèle que l'arsenic a provoqué des lésions cellulaires et des altérations hépatique et rénale clairement révélées au niveau des coupes histologiques, Ceci témoigne de l'effet cytotoxique de l'arsenic et ces métabolites exercés sur ces deux organes cibles les plus susceptibles d'être endommagés.

Dans un second temps, nos résultats montrent que la supplémentation du sélénium (3 mg/kg de poids corporel) ou le pré/co-traitement par l'huile de *Pistacia lentiscus* (3,3 ml/Kg de poids corporel) avec l'arsenic, ont amélioré la plupart des paramètres étudiés.

Associé au sélénium, les perturbations enregistrées avec l'arsenic sont améliorées et le déséquilibre pro-oxydant/antioxydant est réduit, en augmentant :

- ✓ Le taux du glutathion réduit ;
- ✓ L'activité enzymatique de certaines enzymes antioxydantes notamment la glutathion peroxydase, où l'activité de cette enzyme est très dépendante de l'apport en sélénium.

Le pré/co-traitement de l'huile de *Pistacia lentiscus* avec l'arsenic a assuré également une protection contre la cytotoxicité de l'arsenic, Cette protection est due aux propriétés thérapeutiques de l'huile de *Pistacia lentiscus* qui contient plusieurs composés bénéfiques qui ont un pouvoir antioxydant puissant, ces composés agissent par différents mécanismes :

- ✓ En améliorant la séquestration et l'inactivation des radicaux libres ;
- ✓ Par la chélation des métaux rédox ;
- ✓ En augmentant le taux de la glutathion réduit ;
- ✓ En réduisant la peroxydation lipidique par l'intermédiaire de l'induction des antioxydants enzymatiques SOD, CAT et GPx.

C'est ainsi que ces constatations font preuve d'une multitude d'action pharmacologique de l'huile de lentisque contre la cytotoxicité induite par l'arsenic dont les mécanismes moléculaires restent à confirmer.

Les résultats de notre travail ouvrent d'autres nouvelles voies de recherche notamment en ce qui concerne, l'expression de certains gènes important (le glutathion et les métallothionéines) responsables à l'adaptation vis-à-vis le stress oxydatif induit par l'arsenic en présence du sélénium et l'huile de *Pistacia lentiscus*. Parallèlement il pourrait être aussi intéressant d'extraire et de déterminer toutes les molécules bioactives de l'huile de *Pistacia lentiscus* pour mieux caractériser ces effets protecteurs en particulier au niveau des voies de signalisation impliquées.



---

# BIBLIOGRAPHIE

---



- A**bdelwahed, A., Bouhlef, I., Skamdrani, I., Valenti, K., Kadri, M, Guirand, P.,Steiman, R.;Mariotte, A. M., Gherdia, K., Laporte, F., Dijoux, F., Ranca, M. G., and Chekir-Ghedira, L. (2007). Study of antimutagenic and antioxidant activities 1, 2, 3, 4, 6-pentagalloylglucose from *Pistacia lentiscus* confirmation by microarray expression profiling. *Chem. Biol. Inter.* 165, 1-13.
- Abdulah, R., Miyazaki, K., Nakazawa, M., Koyama, H. (2005). Chemical forms of selenium for cancer prevention. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology.* 19 (2-3), 141-150.
- Abernathy, C.O., Liu, Y.P., Longfellow, D., Aposhian, H.V., Beck, B., Fowler, B., Goyer, R., Menzer, R., Rossman, T., Thompson, C., Waalkes, L. (1999). Arsenic: health effects, mechanisms of actions, and research issues. *Environ. Health. Perspect.* 107, 593-597.
- Achard-Joris, M. (2005). Etudes biochimiques et génétiques de la réponse adaptative de mollusques face aux contaminations métalliques et au stress oxydant. Thèse de doctorat d'université : Ecotoxicologie. Université Bordeaux 1. France.216.
- Aebi H. (1984). Catalase *in vitro*. *Methods Enzymol.* 105, 121-126.
- Ahmad, S., Kitchin, K.T., Cullen,W.R. (2002). Plasmid DNA damage caused by methylated arsenical, ascorbic acid and human liver ferritin. *Toxicol. Lett.* 133, 47-57.
- Allen, T., Rana, S.V.S. (2007). Effect of n-propylthiouracil or thyroxine on arsenic trioxide toxicity in the liver of rat. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology.* 21, 194-203.
- Al-Mutairi, D.A., Craik, J.D., Batinic-Haberle, I., Benov, L.T. (2007). Induction of oxidative cell damage by photo-treatment with zinc meta N-methylpyridylporphyrin. *Free radical research.* 41, 89-96.

- Amara, S. (2007). Effets d'une exposition sub-chronique au champ magnétique statique sur le métabolisme du zinc et la toxicité du cadmium chez le rat: Rôle du stress oxydant. Thèse de doctorat. Université du 7 novembre à Carthage. Tunisie.
- Andrews, G.K. (2000). Regulation of metallothionein gene expression by oxidative stress and metal ions. *Biochem. Pharmacol.* 59, 95-104.
- Aposhian, H.V. (1997). Enzymatic methylation of arsenic species and other new approaches to arsenic toxicity. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 37, 397-419.
- Aposhian, H.V., Aposhian, M.M. (1989). Newer developments in arsenic toxicity. *J. Am. Coll. Toxicol.* 8, 1297-1305.
- Aposhian, H.V., Aposhian, M.M. (2006). Arsenic toxicology: Five questions. *Chemical Research in Toxicology.* 19, 1-15.
- Aposhian, H.V., Gurzan, E.S., Le, X.C. (2000). Occurrence of monomethylarsonous acid in urine of humans exposed to inorganic acid. *Chen. Res. Toxicol.* 13, 693-697.
- Aposhian, H.V., Zakharyan, R.A., Wildfang, E.K. (1999). How is inorganic arsenic detoxified? In: Chappell, W.R., Abernathy, C.O., Calderon, R.L. *Arsenic: Exposure and Health Effects.* Elsevier Science Ltd. 289-297.
- Arab, K., Bouchenak, O., Yahiaoui, K. (2014). Etude phytochimique et evaluation de l'activité antimicrobienne et antioxydante de l'huile essentielle et des composés phénoliques du pistachier lentisque (*Pistacia lentiscus* L.). *J. Fundment. Appl. Sci.* 6(1) :79-93.
- Arner, E.S.J. (2009). Focus on mammalian thioredoxin reductases-important selenoproteins with versatile functions. *Biochim. Biophys. Acta.* 1790, 495-526.
- Assimopoulou, A.N., Zlatanov, S.N., Papageorgiou V.P. (2005). Antioxidant activity of natural resins and bioactive triterpenes in oil substrates. *Food Chemistry.* 92, 721-727.

- B**archowsky, A., Dudek, E. J., Treadwell, M. D., Wetterhahn, K.E. (1996). Arsenic induces oxidant stress and NF-kappa B activation in cultured aortic endothelial cells. *Adv. Free. Radic. Biol. Med.* 21, 783-790.
- Basu, A., Mahata, J., Gupta, S., Giri, A.K. (2001). Genetic toxicology of a paradoxical human carcinogen, arsenic: a review. *Mutat. Res.* 488, 171-194.
- Bates, M.N., Smith, A.H., Cantor, K.P. (1995). Case-control study of bladder cancer and arsenic in drinking water. *Am. J. Epidemiol.* 141, 523-530.
- Baudler, S., Krone, W., Bruning, J.C. (2003). Genetic manipulation of the insulin signalling cascade in mice--potential insight into the pathomechanism of type 2 diabetes. *Best. Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 17(3), 431-443.
- Baudoux, D. (2003). L'aromathérapie : Se soigner par les Huiles Essentielles. Amyris. 145-146.
- Baytop, T. (1999). Therapy with medicinal plants in turkey- Past and Present, Second ed. Nobel Publishers, Istanbul.
- Bebianno, M.J., Serafim, M.A. (1998). Comparison of metallothionein induction in response to cadmium in the gills of the bivalve molluscs *Mytilus galloprovincialis* and *Ruditapes decussatus*. *Sci. Total. Environ.* 214, 123-131.
- Belfadel, F.Z. (2009). Huile de fruits de *Pistacia lentiscus* Caractéristiques physicochimiques et effets biologiques (Effet cicatrisant chez le rat). Mémoire de magistère de l'université Mentouri Constantine.
- Belhadj, S. (2000). Les pistacheraies algériennes: Etat actuel et dégradation, Centre Universitaire de Djelfa, Algérie, p 108.
- Bell, S.G., Vallee, B.L. (2009). The metallothionein/thionein system: an oxidoreductive metabolic zinc link. *Chem. biochem* 10, 55-62.

- Bellakhdar, J. (1978). Médecine traditionnelle et toxicologie ouest-sahariennes, contribution à l'étude de la pharmacopée marocaine. Technique nord-africaine. Rabat.
- Beyer WF, Fridovich I. (1987). Assaying for superoxide dismutase activity: Some large consequences of minor changes in conditions. *Anal Biochem.* 161, 559-566.
- Bhourri ,W., Derbel , S., Skandrani ,I., Boubaker,J., Bouhlel, I., B. Sghaier, M., Kilani S., Mariotte , A. M. ; Dijoux-Franca, M. G.; Ghedira , K. and Chekir-Ghedira, L. (2010). Study of genotoxic, antigenotoxic and antioxidant activities of the digallic acid isolated from *Pistacia lentiscus* fruits. *Toxicology in Vitro.* 24: 509-515
- Bhourri, W., Derbel, S., Skandrani, I., Boubaker, J., Bouhlel, I., Sghaier, M.B, Kilani, S., Mariotte, A.M., Dijoux-Franca, M.G., Ghedira, K., Chekir-Ghedira, L. (2010). Study of genotoxic, antigenotoxic and antioxidant activities of the digallic acid isolated from *Pistacia lentiscus* fruits. *Toxicology in Vitro.* 24, 509-515.
- Bioslève, J.B. (2010). Les métaux toxiques. Synthèse journalistique. 1-10.
- Bisson, M. (2002). Toxicologie de l'arsenic. In : Journée technique : Arsenic. Pau, France.
- Biswas, S., Talukder, G., Sharma, A. (1999). Prevention of cytotoxic effects of arsenic by short-term dietary supplementation with selenium in mice in vivo. *Mutation Research.* 441, 155-160.
- Biswas, S., Talukder, G., Sharma, A. (1999). Prevention of cytotoxic effects of arsenic by short-term dietary supplementation with selenium in mice *in vivo*. *Mutation Research.* 441.155-160.
- Bonnefont-Rousselot, D., Thérond, P., Beaudeau, J.L., Peynet, J., Legrand, A., Delattre, J. (2001). Vieillissement et stress oxydant. Quels marqueurs potentiels ?. *Ann. Biol. Clin.* 59(4), 453-459.
- Bonnefont-Rousselot, D., Thérond, P., Delattre, J. (2003). Radicaux libres et anti-oxydants. In : Delattre, J., Durand, G., Jardillier, J.C. *Biochimie pathologique: aspects moléculaires et cellulaires.* Médecine-sciences Flammarion, Paris. 59-81.

- Boukeloua A, Belkhiri A, Djerrou Z, Bahri L, Boulebda N, Hamdi Pacha Y. (2012). Acute toxicity of *Opuntia ficus indica* and *Pistacia lentiscus* seed oils in mice. *Afr J Tradit Complement Altern Med*. 9(4), 607-611.
- Boukeloua, A. (2009). Caractérisation botanique et chimique et évaluation pharmacotoxicologique d'une préparation topique à base d'huile de *Pistacia lentiscus* L. (ANACARDIACEAE). Mémoire de magistère de l'université Mentouri constantine.
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-binding, *Anal. Biochem*. 72, 248-254.
- Burk, R.F. (1994). Selenium in biology and human health. Springer-Verlag . 221.
- Burk, R.F., Hill, K.E., Motley, A.K. (2003). Selenoprotein Metabolism and Function: Evidence for More than One Function for Selenoprotein P. *Journal of Nutrition*. 133(5), 1517S-1520.
- Caussy, D. (2003). Case studies of the impact of understanding bioavailability: arsenic. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 56, 164-173.
- Charef, M., Yousfi, M., Saidi, M., Stocker, P. (2008). Determination of the fatty acid composition of acorn (*Quercus*), *Pistacia lentiscus* seeds growing in Algeria. *J. Am. Oil. Chem. Soc*. 85, 921-924.
- Chattopadhyay, S., Sampa Pal, G., Debidas Ghosh, D., Debnath, J. (2003). Effect of Dietary Co-Administration of Sodium Selenite on Sodium Arsenite-Induced Ovarian and Uterine Disorders in Mature Albino Rats. *Toxicol. Sci*. 75, 412-22
- Chen, Y.C., Lin-Shiau, S.Y., Lin, J. K. (1998). Involvement of reactive oxygen species and caspase 3 activation in arsenite-induced apoptosis. *J. Cell. Physiol*. 177, 324-333.
- Chief, R., (1982). Les plantes médicinales. Solor. 2276-2277.

- CODEX STAN 210-1999. (2001). Codex standard for named vegetable oils[S]. Codex Aliment. 8, 11-25.
- Combs, G., Jr, F., Clark, L.C., Turnbull, B.W. (2001). An analysis of cancer prevention by selenium. *Biofactors*, 14(1-4): 153-159.
- Combs, G.F., Jr. (2001). Impact of selenium and cancer-prevention findings on the nutrition-health paradigm. *Nutrition and Cancer*. 40(1), 6-11.
- Danyelle TM, Kenneth TD. (2003). The role of glutathione-S-transferase in anticancer drug resistance. *Drug Resist*. 22, 7369-75.
- De Vizcaya-Ruiz A, Barbier O, Ruiz-Ramos R, Cebrian ME. (2009). Biomarkers of oxidative stress and damage in human population exposed to arsenic. *Mutat Res*, 674, 85-92.
- Dedoussis, G.V.Z., Kaliora, A.C., Psarras, S., Chiou, A., Mylona, A., Papadopoulos, N.G., Andrikopoulos, N.K. (2004). Antiatherogenic effect of *Pistacia lentiscus* via GSH restoration and downregulation of CD36 mRNA expression. *Atherosclerosis*. 174, 293-303.
- Del Razo, L.M., Quintanilla-Vega, B., Brambila-Colombres, E., Calderon-Aranda, E. S., Manno, M., Albores, A. (2001). Stress proteins induced by arsenic. *Toxicol. Appl. Pharmacol*. 177, 132-148.
- Delattre, J., Thérond, P., Bonnefont-Rousselot, D. (2005). Espèces réactives de l'oxygène, antioxydants et vieillissement. In : Delattre, J., Beaudeau, J.L., Bonnefont-Rousselot, D. Radicaux libres et stress oxydant : aspects biologiques et pathologiques. Lavoisier édition TEC & DOC éditions médicales internationales. Paris. 281-351.
- Dhifi, W., Jelali, N., Chaabani, E., Beji, M., Fatnassi, S., Omri, S., Mnif, W. (2013). Chemical composition of Lentisk (*Pistacia lentiscus* L) seed oil. *Afr. J. Agric. Res*. 8(16), 1395-1400

- Diplock, A.T., Watkins, W.J., Heurson, M. (1985). Ann.Clin.Res. 18: 55.
- Djerrou Z, Hamdi-Pacha Y, Belkhiri AM, Djaalab H, Riachi F, Serakta M, Boukeloua A, Maameri Z. (2011). Evaluation of *Pistacia lentiscus* fatty oil effects on glycemic index, liver functions and kidney functions of New Zealand rabbits. Afr J Tradit Complement Altern Med. 8, 214-219.
- Djerrou Z, Maameri Z, Hamdi-Pacha Y, Serakta M, Riachi F, Djaalab H, Boukeloua A. (2010). Effect of virgin fatty oil of *Pistacia lentiscus* on experimental burn wound's healing in rabbits. Afr J Tradit Complement Altern Med. 7, 258-263.
- Djerrou Z. (2014). Anti-hypercholesterolemic effect of *Pistacia lentiscus* fatty oil in egg yolk-fed rabbits: A comparative study with simvastatin. Chin J Nat Med. 12(8), 561-566.
- Dolezych, B., Szulinska, E. (2003). Selenium modifies glutathione peroxidase activity and glutathione concentration in mice exposed to ozone-provoked oxidative stress. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology. 17 (2), 133-137.
- Ducros, V., Favier, A. (2004). Selenium metabolism. EMC-endocrinologie. 1, 19-28.
- E**l-Demerdash, F.M., Yousef, M.I., Radwan F.M.E. (2009). Ameliorating effect of curcumin on sodium arsenite-induced oxidative damage and lipid peroxidation in different rat organs. Food and Chemical Toxicology. 47, 249-254.
- Emmanuelli, T., Rocha, J.B.T., Pereira, M.E., Nascimento, P.C., Souza, D., Beber, A. (1998). D aminolevulinate dehydratase inhibition by 2,3-dimercaptopropanol is mediated by chelation of zinc from a site involved in maintaining cysteinyl residue in a residue in a reduced state. Pharmacol. Toxicol. 83, 95-103.
- EPA. (2004). Aquatic Life Water Quality Criteria for Selenium. EPA.
- Erlund, I. (2004). Review of the flavonoides quercetin, hesperetin and naringenin: Dietary sources, bioactivities, bioavailability and epidemiology. Nutrition Research. 24 (10), 851-874.

- Ersoz, G., Yakaryilmaz, A., Turan, B. (2003). Effect of sodium selenite treatment on platelet aggregation streptozotocin-induced diabetic rats. *Thrombosis Research*. 111, 363-367.
- Essig, D.A., Nosek, T.M. (1997). Muscle fatigue and induction of stress protein genes: a dual function of reactive oxygen species. *Can. J. Appl. Physiol.* 22, 409-428.
- Esterbauer, H., Gebicki, J., Puhl, H., Jungens, G. (1992). The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radic. Biol. Med.* 13, 341.
- Evans, W.J. (2000). Vitamin E, vitamin C, and exercise. *Am. J. Clin. Nutr.* 72, 647-652.
- F**avier, A. (1997). Le stress oxydant: intérêt de sa mise en évidence en biologie médicale et problèmes posés par le choix d'un marqueur. *Ann. Biol. Clin.* 55 (1), 9-16.
- Favier, A. (2003). Le stress oxydant: Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *Mécanismes biochimiques. L'actualité Chimique*, 108-115.
- Ferreccio, C., Gonzalez, C., Milosavjevic, V., Marshall, G., Sancha, A.M., Smith, A.H. (2000). Lung cancer and arsenic concentrations in drinking water in Chile. *Epidemiology*. 11, 673-679.
- Finco, D.R. (1997). Kidney function. In : Kaneko, J.J., Harvey, J.W., Bruce, M.L. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. Academic press, San Diego, California. 462-478.
- Fishbein, L. (1991). Selenium. In: *Metals and their compounds in the environment. Occurrence, Analysis, and Biological. Relevance.* Merian E., (Ed.) VCH. Washington, DC, U.S.A. 1153-1190.
- Flohe, L., Gunzler, W.A. (1984). Analysis of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.* 105, 114-121.



- Flora, S.J.S. (2011). Arsenic-induced oxidative stress and its reversibility. *Free Radic Biol Med.* 51, 257-281.
- Flora, S.J.S., Bhadauria, S., Pant, S.C., Dhakad, R.K. (2005). Arsenic induced blood and brain oxidative stress and its response to some thiol chelators in rats. *Life. Sci.* 77, 2324-2337.
- Foster, S.J., Kraus, R.J and Ganther, H.E. 1986. The metabolism of selenomethionine, Se-methylselenocysteine, their selenonium derivatives, and trimethylselenonium in the rat. *Arch Biochem Biophys.* 251, 77-86.
- Fox, T.E., Van Den Heuvel, E.G., Atherton, C.A., Dainty, J.R., Lewis, D.J., Langford, N.J., et al. (2004). Bioavailability of selenium from fish, yeast and selenate: a comparative study in humans using stable isotopes. *European Journal of Clinical Nutrition.* 58(2), 343-349.
- Freeman, B.A., Crapo, J.D. (1981). Hyperoxia increases oxygen radical production in rat lungs and lung mitochondria. *J. Biol. Chem.* 256, 10986-10992.
- G**ailer, J., George, G.N., Pickering, I.J., Prince, R.C., Ringwald, S.C., Pemberton, J.E., Glass, R.S., Younis, H.S., Deyoung, D.W., Aposhian, H.V. (2000). A metabolic link between arsenite and selenite: The seleno-bis (S-glutathionyl) arsinium ion. *J. Am. Chem. Soc.* 122, 4637-4639.
- Gailer, J. (2007). Arsenic-selenium and mercury-selenium bonds in biology. *Coord Chem Rev.* 251, 234-54.
- Gailer, J. (2009). Chronic toxicity of AsIII in mammals : the role of (GS)<sub>2</sub>AsSe<sup>-</sup>. *Biochimie.* 91, 1268-72.
- Gan, L., Liu, Q., Xu, H.B., Zhu, Y.S., Yang, X.L. (2002). Effects of selenium overexposure on glutathione peroxidase and thioredoxin reductase gene expressions and activities. *Biol. Trace Elem. Res.* 89, 165-175.

- Gardeli, C., Papageorgiou, V., Mallouchos, A., Theodosis, K., Komaitis, M. (2008). Essential oil composition of *Pistacia lentiscus* L. and *Myrtus communis* L.: Evaluation of antioxidant capacity of methanolic extracts. Food. Chem. 107, 1120-1130.
- Geret, F., Serafim, A., Barreira, L., Bebianno, M.J. (2002). Effect of cadmium on antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in the gills of the clam *Ruditapes decussatus*. Biomarkers. 7, 242-256.
- Ghosh, R., Mukherjee, B., Chatterjee, M. (1994). A novel effect of selenium on streptozotocin-induced diabetic mice. Diabetes Res. 25, 165-71.
- Gresser, M.J. (1981). ADP-arsenate: Formation by submitochondrial particles under phosphorylating conditions. The Journal of Biological Chemistry. 256, 5981-5983.
- Griffith, O.W., Mulcahy, R.T. (1999). The enzymes of glutathione synthesis: gammaglutamyl cysteine synthetase. Adv. Enzymol. Relat. Areas. Mol. Biol. 73, 209-267.
- Grosjean, N. (2007). L'Aromathérapie. Eyrolles. 163.
- Gurer, H., Ozunes, H., Neal, R., Spitz, D.R., Ercal, N. (1998). Antioxidants effects of N-acetylcysteine and succimer in red blood cells from lead exposed rats. Toxicology. 120, 181-189.
- Gurr, J.R., Liu, F., Lynn, S., Jan, K.Y. (1998). Calcium dependent nitric oxide production is involved in arsenite-induced micronuclei. Mutat. Res. 416, 137-148.
- H**abig, W.H., Pabst, M.J., Jacobi, W.B. (1974). The first enzymatic step in mercapturic acid formation. J.Biol.Chem. 249. 7130-7139.
- Halliwell, B., Gutteridge, J. (2000). Reactive species as useful biomolecules. Free Radicals in Biology and Medicine. 467- 481.

- Hamad, H., Hasan, Ibrahim H Habib, Mariam H Gonaid and Mojahidul (2011). Comparative phytochemical and antimicrobial investigation of some plants growing in al jabal al-akhdar. *J Nat Prod Plant Resour.*1 (1), 15-23.
- Hansen, B.H., Romma, S., Garmo, O.A., Olsvik, P.O., Andersen, R.A. (2006). Antioxidative stress proteins and their gene expression in brown trout (*Salmo trutta*) from three rivers with different heavy metal levels. *Comp. Biochem. Physiol. Toxicol. Pharmacol.* 143, 263-274.
- Haq, F., Mahoney, M., Koropatnick, J. (2003). Signaling events for metallothionein induction. *Mutat. Res.* 533, 211-226.
- Haygarth, P.M. (1994). Importance and global cycling of selenium. In: Frankenberger, J., Benson, S. *Selenium in the Environment*. Marcel Dekker, New York. 1-28.
- Hidiroglou, M., Proulx, J. and Jolette, J. 1985. Intraruminal selenium pellet for control of nutritional muscular dystrophy in the dairy cow. *J Dairy Sc.* 68, 57-66.
- Hinwood, A.L., Jolley, D.J., Sim, M.R. (1999). Cancer incidence and high environmental arsenic concentrations in rural populations: results of an ecological study. *J. Environ. Health. Res.* 9, 131-141.
- Hodson, P. V., Hilton, J. W. (1983). The nutritionnal requirements and toxicity to fish of dietary and waterborne selenium. *Ecol. Bull.* 35, 335-340.
- Holzenberger, M., Dupont, J., Ducos, B., Leneuve, P., Geloën, A., Even, P.C., Cervera, P., Le bouc, Y. (2003). IGF-1 receptor regulates lifespan and resistance to oxidative stress in mice. *Nature.* 421(6919): 182-187.
- Houlot, R. (1984). *Techniques d'histopathologie et de cytopathologie*. Ed. Maloine, 19-21, 225-227.
- Hu, Y., Su, L., Snow, E. T. (1998). Arsenic toxicity is enzyme specific and its affects on ligation are not caused by the direct inhibition of DNA repair enzymes. *Mutat. Res.* 408, 203-218.

Huangr, N., Ho, J.C., Yih, L.H., Lee, T.C. (1995). Sodium arsenite induces chromosome endoreplication and inhibits protein phosphate activity in human fibroblasts. *Environ. Mol Mutagen.* 25, 188-196.

Hughes, M.F., Pickering, I.J., Prince, R.C., Younis, H.S., Winzerling, J.J. (2002). Arsenic toxicity and potential mechanism of action. *Chem. Res. Toxicol.* 15, 1466-1471.

**I**inoue, M., Sato, E.F., Nishikawa, M., Park, A.M., Kira, Y., Imada, I., and Utsumi, K. (2003). Mitochondrial generation of reactive oxygen species and its role in aerobic life. *Curr. Med. Chem.* 10 (23), 2495-505.

Irshad M, Chaudhuri PS. (2002). Oxidant-antioxidant system: role and significance in human body. *Indian. J. Exp. Biol.* 40, 1233-9.

Isani, G., Andreani, G., Kindt, M., Carpena, E. (2000). Metallothioneins (MTs) in marine molluscs. *Cell Mol. Biol.* 46, 311-330.

Iserin, P. (2001). *Encyclopédie des Plantes Médicinales, Identification, Préparation, Soin.* Larousse/VUEF. 235(2), 250-250.

**J**anakat, S., Al-Merie, H. (2002). Evaluation of hepatoprotective effect of *Pistacia lentiscus*, *Phillyrea latifolia* and *Nicotiana glauca*. *J Ethnopharmacol.* 83, 135-8.

Janghorbani, M., Xia, Y., Ha, P., Whanger, P.D., Butler, J.A., Olesik, J.W., et al. (1999). Metabolism of selenite in men with widely varying selenium status. *Journal of the American College of Nutrition.* 18(5), 462-469.

Ji, L.L., Fu, R., Mitchell, E.W. (1992). Glutathione and antioxidant enzymes in skeletal muscle: effects of fiber type and exercise intensity. *J. Appl. Physiol.* 73, 1854-1859.

Jing, Y., Dai, J., Chalmers-Redman, R.M. (1999). Arsenic trioxide selectively induces acute promyelocytic leukemia cell apoptosis via a hydrogen peroxide-dependent pathway. *Blood.* 94, 2102-2111.

Johansson, L., Gafvelin, G., Arner, E.S.J. (2005). Selenocysteine in proteins properties and biotechnological use. *Biochim. Biophys. Acta.* 1726, 1-13.

**K**agi, J.H.R., Kojima, Y. (1987). Chemistry and biochemistry of metallothionein. *Expe. suppl.* 52, 25-61.

Kagi, J.H.R., Vallee, B.L. (1960). Metallothionein: a cadmium and zinc containing protein from equine renal cortex. *J. Biol. Chem.* 235, 3460-3465.

Kahouadji, M.S. (1995). Contribution à une étude ethnobotanique des plantes médicinales dans le Maroc oriental. Thèse de troisième cycle d'Université Mohammed I. Oujda. 206.

Kalia, K., Narula, G. D., Kannan ,G.M., Flora S.J.S. (2006). Effects of combined administration of captopril and DMSA on arsenite induced oxidative stress and blood and tissue arsenic concentration in rats. *Comparative Biochemistry and Physiology.* 144, 372-379.

Karleskind, A. (1992). Manuel des Corps Gras, Tech. & Doc. Lavoisier, tome (I-II), p768, p1571.

Kenyon, E.M., Hughes, M.F., Levander, O. A. (1997). Influence of dietary selenium on the disposition of arsenate in the female B6C3F1 mouse. *J. Toxicol. Environ. Health.* 51, 279-299.

Khalil, A. (2002). Molecular mechanisms of the protective effect of vitamin E against atherosclerosis. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 80(7), 662-669.

Kivçak, B., Akay, S. (2005). Quantitative determination of  $\alpha$ -tocopherol in *Pistacia lentiscus*, *Pistacia lentiscus* var. chia, and *Pistacia terebinthus* by TLC-densitometry and colorimetry. *Fitoterapia.* 76, 62-66.

Klaassen, C.D. (1996). Heavy metals and heavy-metal antagonist. In: Gilman, A.G., Rall, T.W., Nies, A.S., Taylor, P. *The Pharmacological Basis of Therapeutics.* McGraw-Hill, New York. 1592-1614.

- Klaassen, C.D., Liu, J., Diwan, B.A. (2009). Metallothionein protection of cadmium toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 238, 215-220.
- Klaassen, C.D., Watkin, J.B. (1984). Mechanism of formation, hepatic uptake and biliary excretion. *Pharmacol. Rev.* 36, 1-67.
- Klotz, L.O., Kröncke, K.D., Buchczyk, D.P., Sies, H. (2003). Role of Copper, Zinc, Selenium and Tellurium in the cellular defense against oxidative and nitrosative stress. *J. Nutr.* 133, 1448S-1451S.
- Kohrle, J. (1999). The trace element selenium and the thyroid gland. *Biochimie.* 81, 527-533.
- Kohrle, J. (2000). The deiodinase family: selenoenzymes regulating thyroid hormone availability and action. *Cell. Mol. Life Sci.* 57, 1853-1863.
- Kono Y, Fridovich I. (1982). Superoxide radical inhibits catalase. *J. Biol. Chem.* 257, 5751-5754.
- Kreppel, H., Liu, J., Liu, Y., Reichl, F. X., Klaassen, C. D. (1994). Zinc-induced arsenite tolerance in mice. *Official Journal of the Society of Toxicology.* 23, 32-37.
- Kruidenier, L., Verspaget, H.W. (2002). Oxidative stress as a pathogenic factor in inflammatory bowel disease - radicals or ridiculous?. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 16, 1997-2015.
- Kumari, M.V., Hiramatsu, M., Ebadi, M. (1998). Free radical scavenging actions of metallothionein isoforms I and II. *Free. Radic. Res.* 29, 93-101.
- L**anglands, J.P., Donald, G.E., Bowles, J.E. and Smith, A.J. 1986. Selenium excretion in sheep. *Austral J Agri Res.* 37, 201-209.
- Laperche, V., Bodéan, F., Dictor, M.C. (2003). Guide méthodologique de l'arsenic appliquée à la gestion des sites et des sols pollués. Rapport BRGM/pp- 52066-FR, Orléans, France : BRGM Edditions, 91.

- Lebreton, P., Salat, O. and Nicol, J. M. 1998. Un point sur le Se. Bull. Tech. GTV.5, 35-47.
- Levander, O.A. (1977). Metabolic interrelationships between arsenic and selenium. Environ. Health Perspect. 19, 159-164.
- Levine, R.L. (2002). Carbonyl modified proteins in cellular regulation; aging and disease. Free radic. Biol.Med. 32, 790-796.
- Li, Z., Piao, F., Liu, S., Wang, Y., Qu, S. (2010). Subchronic exposure to arsenic trioxide-induced oxidative DNA damage in kidney tissue of mice. Exp. Toxicol. Pathol. 62, 543-547.
- Liebl, B., Muckter, H., Sziinicz, L., Thiermann, H., Zilker, T. (2010). Guide pratique de toxicologie. De Boeck. 343(2), 162-163.
- Liu, J. (1995). Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. Journal of Ethnopharmacology. 49, 57-68.
- Liu, J., Liu, Y., Habeebu, S.M., Waalkes, M.P., Kllassen, C.D. (2000). Chronic combined exposure to cadmium and arsenic exacerbates nephrotoxicity, particularly in metallothionein- I/II null mice. Toxicology. 147, 157-66.
- Longo L., Scardino A., Vasapollo G. (2007). Identification and Quantification of Anthocanins in The Berries of *Pistacia lentiscus* L. Elsevier, Italy.
- Luigia, L., Anna, S., Giuseppe, V. (2007). Identification and quantification of anthocyanins in the berries of *Pistacia lentiscus* L., *Phillyrea latifolia* L. and *Rubia peregrina* L. Innovative Food Science and Emerging. Technologies. 8, 360-364.
- Lynn, S., Gurr, J.R., Lai, H.T., Jan, K.Y. (2000). NADH oxidase activation is involved in arsenite induced oxidative DNA damage in human vascular smooth muscle cells. Circ. Res. 86, 514-519.

- M**aarouf, T., Abdenmour, C., Houaine, N. (2008). Influence of *Pistacia lentiscus* oil on serum biochemical parameters of domestic rabbit *Oryctolagus cuniculus* in mercury induced toxicity. *Europ. J. Sc. Res.* 24, 591-600.
- Maggee, R.J., James, B.D. (1996). Selenium. In handbook on metals in clinical and analytical chemistry. Marcel Dekker, Inc; New York.Basel. Hong Kong: 551-562.
- Magos, I., Clarkson, T., Sparrow, S. (1987). *Arch Toxicol.* 60: 422.
- Mandal, B. K., Ogra, Y., Anzai, K., Suzuki, K. T. (2004). Speciation of arsenic in biological samples. *Toxicol Appl Pharmacol.* 198 (3), 307-18.
- Mandal, B.K., Suzuki, K.T. (2002). Arsenic round the world: a review, *Talanta*, 58, 201-235.
- Manna P, Sinha M, Sil PC. (2008). Arsenic-induced oxidative myocardial injury: Protective role of arjunolic acid. *Arch Toxicol.* 82, 137-49.
- Marfak, A. (2003). Radiolyse gamma des flavonoides, étude de leur réactivité avec les radicaux libres issus des alcools : Formation de depsides. Thèse de doctorat de l'université de Limoges.7-7.
- Marnett, L.J. (1999). Lipid peroxidation-DNA damage by Malondialdehyde. *Mutat. Res.* 424, 83-95.
- Marone, P., Bono, L., Leone, E., Bona, S., Carretto, E., Perversi, L. (2001). Bactericidal activity of *Pistacia lentiscus* mastic gum against *Helicobacter pylori*. *J Chemother.* 13, 611-614.
- Martinez-Cayuela, M. (1995). Oxygen free radicals and human disease. *Biochimie.* 77(3), 147-61.
- Mass, M. J., Tennant, B. C., Roop, W. R., Cullen, M., Styblo, D. J. Thomas, A., Kligerman, D. (2001). Methylated trivalent arsenic species are genotoxic. *Chem. Res. Toxicol.* 14, 355-361.



- Matera, V. (2001). Etude de la mobilité et de la spéciation de l'arsenic dans les sols de sites industriels pollués : estimation du risque induit. Université de Pau et des pays d'Adour. Pau, France. 273.
- Mates, J.M., Perez-Gomez, C., Numez de castro, I. (1999). Antioxidant enzymes and human diseases. Clin. Biochem. 32, 595-603.
- Mckenzie, R.C., Arthur, J.R. Beckett, G.J. (2002). Selenium and the regulation of cell signaling, growth and 166 survival: molecular and mechanistic aspects. Antioxid. Redox Signal. 4, 339-351.
- Mershiba, S.M., Dassprakash, M.V., Saraswathy, S.D. (2013). Protective effect of naringenin on hepatic and renal dysfunction and oxidative stress in arsenic intoxicated rats. Mol. Biol. Rep. 40, 3681-3691.
- Mezghani, S. (1992). L'exploitation traditionnelle du maquis au nord de la Tunisie : possibilité d'une meilleure utilisation. Office de l'élevage et des pâturages. Tunis. 99-158.
- Mezni, F., Maaroufi, A., Msallem, M., Boussaid, M., Khouja1, M.A., Khaldi, A.E. (2012). Fatty acid composition, antioxidant and antibacterial activities of *Pistacia lentiscus* L. fruit oils. Journal of Medicinal Plants. Res.6 (39), 5266-5271.
- Misra, M. K. (2009). Oxidative stress and ischemic myocardial syndromes. Med. Sci.Monit. 15 (10), 209-19.
- Mittal, M., Flora, S.J. (2007). Vitamin E supplementation protects oxidative stress during arsenic and fluoride antagonism in male mice. Drug Chem Toxicol, 30 (3), 263-81.
- Modi, M., Gupta, R., Prasad, G.B.K.S, Flora, S.J.S. (2004). Protective value of concomitant administration of trace elements against arsenic toxicity in rats. J. Tissue Res. 4, 257-62.

- Modi, M., Kaul, R.K., Gurusamy, M., Kannan, G.M., Flora, S.J.S. (2006). Co-administration of zinc and n-acetylcysteine prevents arsenic-induced tissue oxidative stress in male rats. *J. Trace. Elem. Med. Biol.* 20, 197-204.
- Modi, M., Kaul, R.K., Gurusamy, M., Kannan, G.M., Flora, S.J.S. (2006). Co-administration of zinc and n-acetylcysteine prevents arsenic-induced tissue oxidative stress in male rats. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology.* 20, 197-204.
- Mohanta, R.K., Garg, A.K., Dass R.S. (2015). Effect of vitamin E supplementation on arsenic induced alteration in blood biochemical profile, oxidant/antioxidant status, serum cortisol level and retention of arsenic and selenium in goats. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology.* 29, 188-194.
- Montagnier, L., Olivier, R., Pasquier, C. (1998). Oxidative stress in cancer. AIDS, and neurodegenerative diseases. *Free Radic. Biol. Med.* 22, 359-378.
- Mouhajir, F., Hudson, J. B., Rejdali, M., Towers, G.H.N. (2001). Multiple antiviral activities of endemic medicinal plants used by Berber peoples of Morocco. *Pharm. Biol.* 39, 364-374.
- Moulos, P., Papadodima, O., Chatziioannou, A., Loutrari, H., Roussos, C., Kolisis, F.N. (2009). A transcriptomic computational analysis of mastic oil-treated lewis lung carcinomas reveals molecular mechanisms targeting tumor cell growth and survival. *BMC Med Genomics.* 2, 68.
- Müller, D. (2004). Analyse génétique et moléculaire du stress arsenic de souches bactériennes isolées d'environnement contaminé par l'arsenic. Thèse de doctorat de l'Université Louis Pasteur, Strasbourg I. 166.

**N**ahida, S.H., Ansari, A.N., Siddiqui. (2012). *Pistacia lentiscus* : A review on phytochemistry and pharmacological properties. *Int.J.Pharm.Sci Vol 4, Suppl 4* : 16-20.

- Nair, J., Barbin, A., Velic, I., Bartsch, H. (1999). Etheno DNA-base adducts from endogenous reactive species. *Mutat.* 424, 59-69.
- Nandi, D., Patra, R.C., Swarup, D. (2005). Effect of cysteine, methionine, ascorbic acid and thiamine on arsenic-induced oxidative stress and biochemical alterations in rats. *Toxicology.* 211, 26-35.
- Navarro-Alarcon, M., Cabrera-Vique, C. (2008). Selenium in food and the human body: A review. *Science of the Total Environment.* 400(1-3), 115-141.
- Nesnow, S., Roop, B. C., Lambert, G., Kadiiska, M., Mason, R. P., Cullen, W. R., Mass, M. J. (2002). DNA damage induced by methylated trivalent arsenicals is mediated by reactive oxygen species. *Chem. Res. Toxicol.* 15, 1627-1634.
- Neve, J., Henry, M., Peretz, A., Mareschi, J.P. (1987). *Cah.Nutr-Diét.* 22:145.
- Nielson, F. (1995). Other trace elements. In: Ziegler, E.E., Filer, L.J. *Present Knowledge in Nutrition*, 7th ed. Press, Washington, DC. 353-377.
- NRC. (1999). Arsenic in drinking water. National Research Council. National Academy Press, Washington, D.C. 310-310.
- Nriagu, J.O., Azcue, J.M. (1990). Environmental sources of arsenic in food. *Adv. Environ. Sci Technol.* 23, 103-127.

**O**rient, A., Donko, A., Szabo, A., Leto, T.L., Geiszt, M. (2007). Novel sources of reactive oxygen species in the human body. *Nephrol. Dial. Transplant.* 22 (5), 1281-8.

**P**acker, L., Tritschler, H.J., Wessel, K. (1997). Neuroprotection by the metabolic antioxidant alpha-lipoic acid. *Free. Radic. Biol. Med.* 22, 359-378.

- Pal, S., Chatterjee, A.K. (2004). Protective effect of methionine supplementation on arsenic- induced alteration of glucose homeostasis. *Food. Chem. Toxicol.* 42, 737-42.
- Pal, S., Chatterjee, AK. (2004). Protective effect of methionine supplementation on arsenic- induced alteration of glucose homeostasis. *Food. Chem. Toxicol.* 42, 737-42.
- Palmiter, R.D. (1998). The elusive function of metallothioneins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 8428-8430.
- Pamplona, R., et al. (2000). Double bond content of phospholipids and lipid peroxidation negatively correlate with maximum longevity in the heart of mammals. *Mech. Ageing. Dev.* 112 (3), 169-83.
- Pastre, J. (2005). Intérêt de la supplementation en antioxydants dans l'alimentation des carnivores domestiques. Thèse de doctorat d'université : vétérinaire. Université de Paul-Sabatier-Toulouse. 116.
- Pehrson, B., Ortman, K., Madjid, N., Trafikowska, V. (1999). The influence of dietary selenium as selenium yeast or sodium selenite on the concentration of selenium in the milk of suckler cows and on the selenium status of their calves. *J. Anim. Sci.* 77, 3371-3376.
- Petrick, J.S., Ayala-Fierro, F., Cullen, W.R., Carter, D.E., Aposhian, H.V. (2000). Monomethylarsonous acid (MMAIII) is more toxic than arsenite in Chang human hepatocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 163, 203-207.
- Petrovic, S., Ozretic, B., Krajnovic-Ozretic, M., Bobinac, D. (2001). Lysosomal membrane stability and metallothioneins in digestive gland of mussels (*Mytilus galloprovincialis* Lam.) as biomarkers in a field study. *Mar Pollut Bull.* 42, 1373-1378.
- Pietta, P.G. (2000). Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products.* 63, 1035-1042.

Piluzza, G., Bullitta, S. (2011). Correlations between phenolic content and antioxidant properties in twenty-four plant species of traditional ethnoveterinary use in the Mediterranean area. *Pharm. Biol.* 49, 240-247.

Poisson, C. (2013). Rôle du stress oxydant au niveau hépatique et rénal dans la toxicité de l'uranium après exposition chronique. Discipline : Toxicologie. Thèse de doctorat de l'université de Paris-sud 11.

**R**affaele, C., Danilo, F., Marongiu, B., Piras, A., Porcedda, S. (2002). Extraction and isolation of *Pistacia lentiscus* L. Essential oil by supercritical CO<sub>2</sub>. Flavour and Fragrance Journal. 17(4) : 239-244.

Ramos, O., Carrizales, L., Yanez, L. (1995). Arsenic increased lipid peroxidation in rat tissues by a mechanism independent of glutathione levels. *Environ. Health Perspect.* 103, 85-88.

Rayman, M.P. (2004). The use of high-selenium yeast to raise selenium status: how does it measure up? *Br. J. Nutr.* 92, 557-573.

Rayman, M.P., Infante, H.G., Sargent, M. (2008). Food-chain selenium and human health: spotlight on speciation. *British Journal of Nutrition.* 100(2), 238-253.

Reichl, F.X., Benecke, J., Benecke, M., Eckert, K.G., Erber, B., CGolly, I., Kreppel, H.,

Reilly, C., (2006). *Selenium in Food and Health*. Springer, New York.

Rejeb, M.N., Khouja, M.L., Ghrabi, Z., Chemli, R., Albouchi, A., Khaldi, A., Dahman, M. (2006). Guide des plantes médicinales et aromatiques. *Maghreb*. Tunis. Tunisie. 25-26.

Rios, J. L., Recio, M. C., Manez, S., Giner, R. M. (2000). Natural triterpenoids as antiinflammatory agents. In Atta-Ur-Rahman (Ed.). *Studies in natural products chemistry: Bioactive natural products* (Vol. 22, pp. 93-143). Amsterdam: Elsevier, part C.

- Romani, A., Pinelli, P., Galardi, N., Mulinacci, N., Tattini, M. (2002). Identification and quantification of galloyl derivatives, flavonoid glycosides and anthocyanins in leaves of *Pistacia lentiscus* L. *Phytochem. Anal.* 13, 79-86.
- Ronald, L., Koretz, M.D. (1992). Chronic hepatitis: science and superstition. In: Gitnick, G. *Current Hematology*. 12. Mosby-Year, Chicago. 53-75.
- Rossman, T. G., Roy, N. K., Lin, W. C. (1992). Is cadmium genotoxic?. IARC scientific publications. 367-375.
- Rossman, T.G. (2003). Review: Mechanism of arsenic carcinogenesis: an integrated approach. *Mutation Research*. 533, 37-65.
- Saha, S.S., Ghosh, M. (2009). Comparative study of antioxidant activity of  $\alpha$ -eleostearic acid and punicic acid against oxidative stress generated by sodium arsenite. *Food. Chem. Toxicol.* 47, 2551-2556.
- Saha, S.S., Ghosh, M. (2010). Ameliorative role of conjugated linolenic acid isomers against oxidative DNA damage induced by sodium arsenite in rat model. *Food. Chem. Toxicol.* 48. 3398-3405.
- Santure, M. (2002). Induction of insulin resistance by high-sucrose feeding does not raise mean arterial blood pressure but impairs haemodynamic responses to insulin in rats. *Br. J Pharmacol.* 137(2), 185-96.
- Saxena, P.N., Anand, S., Saxena, N., Bajaj, P. (2009). Effect of arsenic trioxide on renal functions and its modulation by Curcuma aromatic leaf extract in albino rats. *J. Environ. Biol.* 30, 527-531.
- Schiferl, D., Barrett, C. S. (1969). The crystal structure of arsenic at 4.2, 78 and 299 degrees. *J. Appl. Cryst.* 2, 30-36.
- Schoolmeester, W.L., White, D.R., (1980). Arsenic poisoning. *South Med. J.* 73, 198- 208.

- Schrauzer, G.N. (2000). Selenomethionine: a review of its nutritional significance, metabolism and toxicity. *Journal of Nutrition*. 130(7), 1653-1656.
- Schultz, A. (1984). Uric acid. A et al. Clin Chem The C.V. Mosby Co. St Louis. Toronto. Princeton. 1261-1266.
- Seigue, A. (1985). La Forêt Circum méditerranéenne et ses Problèmes, Maisonneuve & Larose. 22- 27, 137 - 139.
- Sen, C.K. (2001). Antioxidant and redox regulation of cellular signaling: Introduction. *Med. Sci Sport.s Exer* .33 (3), 368-370.
- Shila, S., Kokilavani, V., Subathra, M., Panneerselvam , C. (2005). Brain regional responses in antioxidant system to  $\alpha$ -lipoic acid in arsenic intoxicated rat. *Toxicology*. 210, 25-36.
- Shiobara, Y., Yoshida, T., Suzuki, K.T. (1998). Effects of dietary selenium species on Se concentrations in hair, blood, and urine. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 152(2), 309-314.
- Simeonova, D.D. (2004). Arsenic oxidation of *Cenibacterium arsenoxidans*: Potential application in bioremediation of arsenic contaminated water. Thèse de doctorat d'Université – Université Louis Pasteur de Strasbourg et Université de Sofia. France.
- Simonoff, M., Simonoff, G. (1991). Le sélénium et la vie. Centre National de la Recherche Scientifique. Masson . Paris. 242.
- Smail-Saadoun, N. (2002). Types stomatiques du genre *Pistacia*: *Pistacia atlantica* Desf.ssp. *atlantica* et *Pistacia lentiscus* L. p 369.
- Smedley, P.L., Kinniburgh, D.G., (2002). A review of the source, behaviour and distribution of arsenic in natural waters. *Appl. Geochem*. 17, 517-569.
- Smith, E.J., Davison, W., Hamilton-Taylor, J. (2002). Methods for preparing synthetic fresh waters. *Water Res*. 36, 1286-1296.

- Sohal, R.S., Mockett, R.J., Orr, W.C. (2002). Mechanisms of aging: an appraisal of the oxidative stress hypothesis. *Free Rad. Biol. Med.* 33 (5), 575-586.
- Stybło, M., Thomas, D. (1997). Binding of arsenicals to proteins in an in vitro methylation system. *Toxicology Applied Pharmacology*. 147, 1-8.
- Suzuki, K.T., Ogra, Y. (2002). Metabolic pathway for selenium in the body: speciation by HPLC-ICP MS with enriched Se. *Food Additives and Contaminants*, 19(10): 974-983.
- Tandon, S.K., Klandwal, S., Jain, V.K., Marthur, N. (1993). Influence of dietary iron deficiency on acute metal intoxication. *Industrial. Toxicologie. Research. Center. Biometals.* 6, 133-38.
- Tanguy, M., Marie, A., Simon, B. (2009). Antioxydants Première partie : les antioxydants dans l'alimentation. *Médecine*. 256-260.
- Tapiero, H., Townsend, D., KD, T. (2003). The antioxydant role of selenium and selenocompounds. *Biomedecine and Pharmacotherapy*. 7: 134-144.
- Thannickal, V.J., Fanburg, B.L. (2000). Reactive oxygen species in cell signaling. *Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol.* 279 (6), 1005-28.
- Thérond, P., Bonnefont-Rousselot D. (2005). "Systèmes antioxydants endogènes." *Radicaux libres et stress oxydant*. Paris, Lavoisier: p 87-111.
- Thérond, P., Denis, B. (2005). Cibles lipidiques des radicaux libres dérivés de l'oxygène et de l'azote : effets biologiques des produits d'oxydation du cholestérol et des phospholipides. In Delattre, J., Beaudoux, J.L, Bonnefont-Rousselot, D. *Radicaux libres et stress oxydant : aspects biologiques et pathologiques*. Lavoisier édition TEC & DOC éditions médicales internationales, Paris. 114-167.
- Thomson, J., Neve, J. (1991). Physiological and nutritional importance of selenium. *Experientia*. 47, (2): 187-193.



- Thornalley, P.J., Vasak, M. (1985). Possible role for metallothionein in protection against radiation-induced oxidative stress. Kinetics and mechanism of its reaction with superoxide and hydroxyl radicals. *Biochim. Biophys. Acta.* 827, 36-44.
- Tinggi, A. (2003). Essentiality and toxicity of selenium and its status in australia: a review. *Toxicology Letters.* 137, 103-110.
- Trabelsi, H., Cherif, O.A., Sakouhi, F., Villeneuve, P., Renaud, J., Barouh, N., Boukhchina, S., Mayer, P. (2012). Total lipid content, fatty acids and 4-desmethylsterols accumulation in developing fruit of *Pistacia lentiscus* L. growing wild in Tunisia. *Food. Chem.* 131, 434-440.
- Tsao, R. (2010). Chemistry and Biochemistry of Dietary polyphenols. *Nutrients.* 2 (12), 1231-1246.
- Tseng, W.P., Chu, H.M., How, S.W., Fong, J.M., Lin, C.S., Yeh, S. (1968). Prevalence of skin cancer in an endemic area of chronic arsenicism in Taiwan. *J. Natl. Cancer Inst.* 40, 453-463.
- Tulzaci, E., Aymaz, P.E. (2001). Turkish folk medicinal plants, Part IV : (Gonen (Bahkesir)). *Fitoterapia.* 72, 323-343.
- V**alko, M., C.J. Rhodes, J. Moncol, *et al.* (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact.* 160, 1-40.
- Van Cauwenbergh, R., Robberecht, H., Van Vlaslaer, V., Deelstra, H. (2004). Comparison of the serum selenium content of healthy adults living in the Antwerp region (Belgium) with recent literature data. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology.* 18(1), 99-112.
- Vertuani, S., Angusti, A., Manfredini, S. (2004). The antioxidants and pro-antioxidants network : an overview. *Curr. Pharm. Des.* 10(14), 1677-94.
- Viala, A. (2007). *Toxicologie. La voisier.* Paris. 1122(2), 583-590.

- Viarengo, A., Ponzano, E., Dondero, F., Fabbri, R. (1997). A simple spectrophotometric method for metallothionein evaluation in marine organisms: An application to Mediterranean and Antarctic mollusks. *Mar Environ Res.* 44, 69-84.
- Vicentini, F.T., SHao, Y., Fonseca, M.J., Fisher., G.J, Xu, Y. (2011). Quercitin inhibits UV radiation-induced inflammatory cytokine production in primary human keratinocytes by supressing NF-KB. *Journal of Dermatological Science.* 61, 162-168.
- Vignais, P.V. (2002). The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism. *Cell. Mol. Life. Sci.* 59(9), 1428-59.
- Wallace, K., Kelsey, K.T., Schned, A., Morris, J.S., Andrew, A.S., Karagas, M.R. (2009). Selenium and risk of bladder cancer: a population-based case-control study. *Cancer Prevention Research.* 2(1), 70- 73.
- Wang, T.S., Kuo, C. F., Jan, K. Y., Huang, H. (1996). Arsenite induces apoptosis in Chinese hamster ovary cells by generation of reactive oxygen species. *J. Cell. Physiol.* 169, 256-268.
- Wang, T.S., Shu, Y.F., Liu, Y.C. (1997). Glutathione peroxidase and catalase modulate the genotoxicity of arsenite. *Toxicology.* 121, 229-237.
- Wardman, P., Candeias, L.P. (1996). Fenton chemistry: an introduction. *Radiat Res.* 145 (5), 523-531.
- Weber, P., Bendich, A., Machlin, L.J. (1997). Vitamin E and human health: rationale for determining recommended intake levels. *Nutrition.* 13, 450-460.
- Weckbeker, G., Cory, J.G. (1988). Ribonucleotide reductase activity and growth of Glutathoine-depleted mous leukemia L1210 cells *in vitro*. *Cancer letters.* 40, 257-264.
- Weijl, N.I., Cleton, F.J, Osanto, S. (1997). Free radicals and antioxidants in chemotherapy-induced toxicity. *Cancer. Treat. Rev.* 23, 209-240.

- Welch, W.J. (1992). Mammalian stress response: cell physiology, structure/function of stress proteins, and implications for medicine and disease. *Physiol. Rev.* 72, 1063-1081.
- Whanger, P.D. (2002). Selenocompounds in plants and animals and their biological significance. *J Am Coll Nutr.* 21(3): 223-32.
- Whanger, P.D. (2004). Selenium and its relationship to cancer: an update. *British Journal of Nutrition.* 91(1), 11-28.
- Wolfgang, H. (2007). 350 plantes médicinales. Les indispensables natures de Delachaux. Delachaux et Niestlé SA, Paris. 256, 226-226.
- Wu, C.H., Lin, J.A., Hsieh, W.C., Yen, G.C. (2009). "Low-density-lipoprotein (LDL)-bound flavonoids increase the resistance of LDL to oxidation and glycation under pathophysiological concentrations of glucose in vitro. *J. Agric. Food. Chem.* 57 (11), 5058-5064.

**X**u, Z., Wang, Z., Li, J., Chen, C., Zhang, P., Dong, L., Chen, J., Chen, Q., Zhang, X., Wang, Z. (2013). Protective effects of selenium on oxidative damage and oxidative stress related gene expression in rat liver under chronic poisoning of arsenic. *Food and Chemical Toxicology.* 58, 1-7.

**Y**amanaka, K., Hayashi, H., Kato, K., Hasegawa, A., Tachikawa, M., Oku, N., Okada, S. (1997). Metabolic methylation is a possible genotoxicity-enhancing process of inorganic arsenics. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 394, 95-101.

Yoshihara, D., Fujiwara, N., Suzuki, K. (2010). "Antioxidants : benefits and risks for longterm health." *Maturitas.* 67(2), 103-107.

Yoshikawa, T., Yamamoto, Y., Naito, Y. (2000). Free radicals in chemistry, biology and medicine, Oica International, Londres.

Youssef IM, El-Demerdash MM, Radwan FME. (2008). Sodium arsenite induced biochemical perturbations in rats: Ameliorating effect of curcumin. *Food Chem Toxicol.* 48, 3506-11.

**Z**achara, B.A., Frafikowska, V., Lejman, H., Kimber, C. and Kaptur, M. (1993).

Selenium and glutathione peroxidase in blood of lambs born to ewes injected with barium selenate. *Small Ruminant Research.* 11, 135-141.

Zakharyan, R.A., Aposhian, H.V. (1999). Enzymatic reduction of arsenic compounds in mammalian systems: The rate-limiting enzyme of rabbit liver arsenic biotransformation is MMA (V) reductase. *Chemical Research in Toxicology.* 12, 1278-1283.

Zelko, I.N., Marian, T.J., Folz, R.J. (2002). Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Rad. Biol. Med.* 33 (3): 337-349.

Zeng, H., Uthus, E.O., Gerald, F. Combs, J. (2005). Mechanistic aspects of the interaction between selenium and arsenic. *Journal of Inorganic Biochemistry.* 99, 1269-1274.

---



# ANNEXES

---

## Préparation des solutions

### 1. Dosage des protéines par la méthode de Bradford

- ❖ **BSA (1 mg/ml)** : Dissoudre 5 mg BSA dans 5 ml d'eau distillée.
- ❖ **Réactif de Bradford** : Dissoudre 100 mg de bleu de Coomassie (G 250) dans 50 ml d'éthanol (95%). Agiter par l'agitateur pendant 2 heures, puis ajouter 100 ml d'acide orthophosphorique (85%) et 850 ml d'eau distillée (pour obtenir 1 L de solution). Ce réactif doit être filtré puis conserver pendant 1 mois au maximum à une température de 4°C et à l'abri de la lumière.

### 2. Dosage du MDA

- ❖ **TBS ; Tris (50mM), NaCl (150mM) et pH 7,4** : Dissoudre 8,775 g NaCl dans 1L d'eau distillée, puis poser 6,057g Tris et compléter le volume à 1L par la solution NaCl (150 mM) et ajuster le pH à 7,4.
- ❖ **TCA-BHT (TCA 20%, BHT 1%)** : Dissoudre 20 g TCA dans 100 ml d'eau distillée pour obtenir la solution TCA 20% puis poser 1 g de BHT et compléter le volume à 100 ml par la solution TCA 20% et agiter à chaud.
- ❖ **HCl 0.6 M** : Prélever 51,56 ml d'HCl et compléter le volume à 1 L par l'eau distillée.
- ❖ **Tris-TBA (Tris 26 mM, TBA 120 mM)** : Dissoudre 3,149 g Tris dans 1 L d'eau distillée, puis poser 17,299 g TBA et compléter le volume à 1 L par la solution Tris (26 mM).

### 3. Dosage du glutathion

- ❖ **Tris (0,4 M), EDTA (0,02 M) et pH 9,6** : Dissoudre 12,114 g Tris et 1,871 g EDTA dans 250 ml d'eau distillée et ajuster le pH à 9,6.
- ❖ **EDTA (0,02 M)** : Dissoudre 5,613 g EDTA dans 750 ml d'eau distillée.
- ❖ **DTNB (0,01 M)** : Dissoudre 200 mg DTNB dans 50 ml de méthanol absolu.
- ❖ **L'acide salicylique (0,25%)** : Dissoudre 250 mg d'acide salicylique dans 100 ml d'eau distillée.

### 4. Dosage des métallothionéines

- ❖ Tampon d'homogénéisation, **Tris** (50 mM, pH 8,6) : 6,057 g de Tris + 0,357 ml de  $\beta$  mercaptoéthanol, compléter à 1 l avec de l'eau bidistillée et ajuster le pH à 8,6.

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

- ❖ **GSH (0.1 mM)** : Dissoudre 3,073 mg GSH dans 100 ml d'eau distillée.
- ❖ **TCA (1%)** : Dissoudre 1 g TCA dans 100 ml d'eau distillée.
- ❖ **DTNB (1,0 mM)** : Dissoudre 100 mg DTNB dans 250 ml de méthanol absolu.

#### 6. Dosage de l'activité enzymatique de la Glutathion-S-Transférase (GST)

- ❖ **CDNB (0,02 M)** : Dissoudre 202,55 mg CDNB dans 50 ml d'éthanol absolu.
- ❖ **Solution GSH (0,1 M)** : Dissoudre 153,65 mg GSH dans 50 ml d'eau distillée.

#### 7. Dosage de l'activité enzymatique de la catalase (CAT)

- ❖ **Tampon phosphate (0.1 M, pH 7.4)**

Solution A, dissoudre 6,24 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (2  $\text{H}_2\text{O}$ ) dans 200 ml d'eau distillée.

Solution B, dissoudre 14.32 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (12  $\text{H}_2\text{O}$ ) dans 200 ml d'eau distillée.

Mélanger 16 ml de la solution A avec 84 ml de la solution B

#### 8. Dosage de l'activité enzymatique de la superoxyde dismutase (SOD)

- ❖ **EDTA-Met (0,1 mM, 13 mM)** : dissoudre 50 mg EDTA  $\text{Na}_2$  dans 50 ml tampon phosphate, prendre 11.16 ml de cette solution et ajouter 580 mg méthionine puis compléter avec 88,84 ml tampon phosphate.
- ❖ **NBT (75  $\mu\text{M}$ )** : dissoudre 10,79 mg dans 5 ml tampon phosphate
- ❖ **Riboflavine (2  $\mu\text{M}$ )** : dissoudre 0,1 mg dans 1 ml tampon phosphate



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DU COMMERCE

## METHODE D'ANALYSE

☐ Machin  
☐ Others

CORPS GRAS D'ORIGINES ANIMALE ET VEGETALE

DETERMINATION DE L'INDICE DE PEROXYDE

**1- DEFINITION**

Indice de peroxyde: quantité de produit présent dans l'échantillon, exprimée en milliéquivalents d'oxygène actif par kilogramme, oxydant l'iodure de potassium, dans les conditions opératoires décrites.

**2- Principe**

traitement d'une priforme, par une solution d'iodure de potassium, titrage de l'ise d'essai, en solution dans de l'acide acétique et du chloroforme libéré par une solution titrée de thiosulfate de sodium.

**3- Réactifs**

Tous les réactifs doivent être de qualité analytique. L'eau utilisée doit être de l'eau distillée de pureté au moins équivalente. Tous les réactifs doivent être exempts d'oxygène dissout.

**3.1- Chloroforme**, privé d'oxygène par barbotage d'un courant de gaz inerte, pur et sec.

**3.2- Acide acétique** cristallisable, privé d'oxygène par barbotage d'un courant de gaz inerte, pur et sec.

**3.3- Iodure de potassium**, solution aqueuse saturée, récemment préparée, exempte d'iode et iodates.

**NOTE**

S'assurer que la solution reste saturée, ce qui est indiqué par la présence de cristaux nondissouts. Conserver à l'obscurité.

Vérifier tous les jours par addition de 2 gouttes de l'empois d'amidon (3.5) à 0.5ml de la solution d'iodure de potassium dans 30ml de solution d'acide acétique et de chloroforme (3.2).

Si une coloration bleue apparaît et demande plus de 1 goutte de solution de thiosulfate de sodium 0.01N

pour disparaître, rejeter la solution d'iodure de potassium et préparer une nouvelle solution.

**3.4- Thiosulfate de sodium**, solution titrée 0.01N ou 0.002N, étalonnée immédiatement avant l'emploi.

**3.5- Empois d'amidon**

Mélanger 5g d'amidon soluble avec 30ml d'eau bouillante, et laisser bouillir durant 3 minutes.

**4- Appareillage**

Tout le matériel doit être exempt de substances réductrices ou oxydantes.

**NOTE**

Ne pas utiliser de graisse pour les rodages en verre.

**4.1- Flacons**, à col rodé, munis de bouchons en verre rodés, de capacité environ 250ml, préalablement séchés et remplis d'un gaz inerte, pur et sec ( azote ou, de préférence, dioxyde de carbone).

**4.2- Nacelles** en verre, de capacité appropriée à la prise d'essai.

**4.3- Burette**

**4.4- Balance** analytique

**5- Echantillonnage**

Voir méthode officielle n° 11 95 00

S'assurer lors du prélèvement et de la conservation de l'échantillon, que celui-ci est à l'abri de la lumière vive, maintenu au froid et contenu dans des récipients en verre, munis de bouchon en verre rodé ou de bouchon en liège, complètement remplis et hermétiquement clos.

**6- Mode opératoire**

L'essai doit être effectué en lumière du jour diffuse ou en lumière artificielle.



**6.1- Prise d'essai**

Peser, à 0.01g près, l'échantillon dans des flacons (4.1), une masse de l'échantillon conforme au tableau suivant, selon l'indice de peroxyde présumé. Si le flacon ne peut être pesé directement, peser la prise d'essai dans des nacelles en verre (4.2).

**6.2- Détermination**

Si la pesée a été effectuée dans la nacelle (4.2), introduire, dans l'un des flacons (4.1), la nacelle contenant la prise d'essai.

Ajouter 10ml du chloroforme (3.1). Dissoudre rapidement la prise d'essai en agitant.

Ajouter 15ml de l'acide acétique (3.2), puis 1ml de la solution d'iodure de potassium (3.3).

Boucher aussitôt le flacon, l'agiter durant 1 minute et le laisser durant 5 minutes exactement, à l'abri de la lumière, à une température comprise entre 15 et 25°C.

Ajouter environ 75ml d'eau. En agitant vigoureusement et en présence de quelques gouttes de l'empois d'amidon (3.5) comme indicateur, titrer l'iode libéré avec la solution de thiosulfate de sodium (3.4), en utilisant la solution 0.002N pour les indices présumés inférieurs ou égaux à 12 et la solution 0.01N pour les indices présumés supérieurs à 12.

Effectuer deux déterminations sur le même échantillon pour essai.

6.3- parallèlement à la détermination, effectuer un essai à blanc. Si le résultat de l'essai à blanc dépasse 0.1ml de solution de thiosulfate de sodium 0.1N (3.4), remplacer les réactifs impurs.

**7- Expression des résultats****7.1- Mode de calcul et formule.**

L'indice de peroxyde, exprimé en milliéquivalents oxygène actif par kilogramme d'échantillon, est égal à :

$$\frac{V_1 - V_0}{m} \times 100$$

$V_0$  Est le volume, en millilitres, de la solution de thiosulfate de sodium (3.4), utilisé pour l'essai à blanc;

$V_1$  Est le volume, en millilitres, de la solution de thiosulfate de sodium (3.4), utilisé pour la détermination;

$T$  Est la normalité de la solution de thiosulfate de sodium (3.4), utilisée;

$m$  Est la masse en gramme, de la prise d'essai.

Prendre comme résultat la moyenne arithmétique des deux déterminations effectuées.

**NOTE**

L'indice de peroxyde peut être également exprimé en millimoles par kilogramme ou en microgrammes d'oxygène actif par gramme (Voir annexe)

**7.2- Répétabilité**

La différence entre les résultats de deux déterminations, effectuées simultanément ou rapidement l'une après l'autre, par le même analyste, sur le même échantillon, ne doit pas dépasser les valeurs suivantes:

**ANNEXE****FACTEURS DE CONVERSION**

Pour exprimer l'indice de peroxyde en millimoles d'oxygène actif par kilogramme de matière grasse ou en microgrammes d'oxygène actif par gramme de matière grasse, multiplier le résultat obtenu en 7.1 par les facteurs de conversion indiqués dans le tableau suivant:



## REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

## MINISTERE DU COMMERCE

## METHODE D'ANALYSE

## CORPS GRAS D'ORIGINES ANIMALE ET VEGETALE

## DETERMINATION DE L'INDICE D'ACIDE ET DE L'ACIDITE

## 1/ Domaine d'application

La présente méthode spécifie deux méthodes (titrimétrique et potentiométrique) de détermination des acides gras libres dans les corps gras d'origines animale et végétale.

Les acides sont exprimés, de préférence, par l'indice d'acide ou en alternative, par l'acidité calculée conventionnellement

La méthode est applicable aux corps gras d'origines animale et végétale. Elle n'est pas applicable aux cires.

## 2/ Références

Méthode officielle n° 11 95 01: Corps gras d'origines animale et végétale: préparation de l'échantillon pour essai.

## 3/ Définition

Dans le cadre de la présente méthode, les définitions suivantes sont applicables.

**3.1 / Indice d'acide :** Nombre de milligrammes d'hydroxyde de potassium nécessaires pour neutraliser les acides gras libres présents dans 1 g de corps gras

**3.2/ Acidité :** Expression conventionnelle du pourcentage d'acides gras libres.

Selon la nature du corps gras, l'acidité peut aussi être exprimée comme indiqué dans le tableau 1.

Si le résultat indique simplement " acidité " sans autre précision, elle est par convention exprimée en pourcentage d'acide oléique.

Si l'échantillon contient des acides minéraux, ceux-ci sont par convention déterminés comme les acides gras.

TABLEAU I

Nature du corps gras	Expression	Masse molaire g/mol
Huile de coprah, huile de palmiste et huiles similaires	Acide laurique	200
Huile de palme	Acide palmitique	256
Huiles de certaines crucifères	Acide érucique	338
Tous autres corps gras	Acide oléique	282

## 4/ Méthode titrimétrique

## 4.1/ Généralités

Cette méthode convient particulièrement aux corps gras qui ne sont pas fortement colorés.

## 4.2/ Principe

Mise en solution d'une prise d'essai dans un mélange de solvants, puis titrage des acides gras libres présents à l'aide d'une solution éthanolique d'hydroxyde de potassium.

## 4.3/ Réactifs

Tous les réactifs doivent être de qualité analytique reconnue, et l'eau utilisée doit être de l'eau distillée.

\* Dans le cas de l'huile de colza à faible teneur en acide érucique, l'acidité doit être exprimée en acide oléique.



4.3.1/ Oxyde diéthylique/ éthanol à 95% (V/V) mélange 1 + 1 (V/V).

#### AVERTISSEMENT

L'oxyde diéthylique est très inflammable et peut former des peroxydes explosifs. Il doit être utilisé en prenant des précautions particulières.

Neutraliser exactement au moment de l'emploi avec la solution d'hydroxyde de potassium (4.3.2) en présence de 0,3 ml de la solution de phénolphthaléine (4.3.3) pour 100 ml de mélange.

#### NOTE

S'il n'est pas possible d'utiliser l'oxyde diéthylique, un mélange de solvants formé d'éthanol et de toluène peut être utilisé. Si nécessaire, l'éthanol peut être remplacé par le propanol-2.

4.3.2/ Hydroxyde de potassium, solution éthanolique titrée,  $c(\text{KOH}) = 0,1 \text{ mol/l}$ , ou, si nécessaire,  $c(\text{KOH}) = 0,5 \text{ mol/l}$ .

La concentration exacte de la solution éthanolique d'hydroxyde de potassium doit être connue, et vérifiée immédiatement avant l'emploi. Utiliser la solution préparée au moins 5 jours avant l'emploi et décantée dans un flacon en verre brun fermé avec un bouchon en caoutchouc.

La solution doit être incolore ou jaune paille.

#### NOTE

Une solution incolore stable d'hydroxyde de potassium peut être préparée de façon suivante : Porter et maintenir durant 1 h à l'ébullition à reflux 1000 ml d'éthanol avec 8 g d'hydroxyde de potassium et 0,5 g de rognures d'aluminium. Distiller immédiatement. Dissoudre dans le distillat la quantité requise d'hydroxyde de potassium.

Laisser reposer durant plusieurs jours et décanter le liquide clair surnageant du précipité de carbonate de potassium.

La solution peut aussi être préparée sans distillation de la façon suivante :

A 1000 ml d'éthanol, ajouter 4 ml de butylate d'aluminium et laisser reposer le mélange durant quelques jours.

Décanté le liquide surnageant et y dissoudre la quantité requise d'hydroxyde de potassium. Cette solution est prête pour l'emploi

4.3.3 / Phénolphthaléine, solution à 10 g/l dans l'éthanol 95 à 96% (V/V) ou bleu alcalin ( dans le cas de corps gras fortement colorés) solution à 20 g/l dans l'éthanol 95 à 96 % (V/V).

#### 4.4/ Appareillage

Matériel courant de laboratoire, et notamment:

##### 4.4.1/ Balance analytique.

##### 4.4.2/ Fiole conique, de 250 ml de capacité

##### 4.4.3/ Burette, de 10 ml de capacité, graduée en 0,1 ml

##### 4.5/ Echantillonnage

Prélever l'échantillon pour laboratoire conformément à la méthode officielle 11 95 00

##### 4.6/ Mode opératoire

##### 4.6.1/ Préparation de l'échantillon pour essai

Préparer l'échantillon pour essai conformément à la méthode officielle n° 11 95 01

##### 4.6.2/ Prise d'essai

Prélever une prise d'essai, selon l'indice d'acide présumé, d'après les indications du tableau 2

TABLEAU 2

Indice d'acide présumé	Masse de la prise d'essai g	Précision de prise d'essai g
<1	20	0.05
1 à 4	10	0.02
4 à 15	2.5	0.01
15 à 75	0.5	0.001
>75	0.1	0.002

Peser la prise d'essai la fiole conique (4.4.2)

##### 4.6.3 / Détermination

Dissoudre la prise d'essai (4.6.2) dans 50 à 150 ml du mélange oxyde diéthylique / éthanol (4.3.1) préalablement neutralisé.

Titre, en agitant avec la solution d'hydroxyde de potassium à 0,1 mol/l 4.3.2 (voir note 3) jusqu'à virage de l'indicateur (coloration rose de la phénolphthaléine persistant durant au moins 10s).



## NOTES

1/ Dans le cas d'indices très faibles (< 1), il est préférable de faire passer un léger courant d'azote dans la solution d'essai.

2/ La solution éthanolique titrée d'hydroxyde de potassium (4.3.2) peut être remplacée par une solution aqueuse d'hydroxyde de potassium ou de sodium lorsque le volume d'eau introduit n'entraîne pas une séparation de phases.

Si la quantité nécessaire de solution d'hydroxyde de potassium à 0,1 mol/l dépasse 10 ml, utiliser une solution à 0,5 mol/l.

Si la solution devient trouble pendant le titrage, ajouter une quantité suffisante du mélange de solvants (4.3.1) pour donner une solution claire.

#### 4.6.4 Nombre de déterminations

Effectuer deux déterminations sur le même échantillon pour essai.

### 5/ METHODE POTENTIOMETRIQUE

La présente méthode est d'application générale, mais elle est plus particulièrement destinée aux corps gras bruts de couleur foncée en raison de la difficulté d'application, dans ce cas, d'une méthode titrimétrique.

#### 5.1/ Principe

Titration potentiométrique des acides gras libres présents dans une prise d'essai à l'aide d'une solution isopropanolique d'hydroxyde de potassium en milieu non aqueux.

#### 5.2/ Réactifs

Tous les réactifs doivent être de qualité analytique reconnue, et l'eau utilisée doit être de l'eau distillée.

5.2.1/ Méthylisobutylcétone, neutralisé au moment de l'emploi avec la solution isopropanolique d'hydroxyde de potassium (5.2.2) en présence de phénophtaléine, jusqu'au virage au rose.

5.2.2/ Hydroxyde de potassium, solution titrée,  $c(\text{KOH}) = 0,1 \text{ mol/l}$  ou  $0,5 \text{ mol/l}$ .

5.2.2.1/ Hydroxyde de potassium, solution titrée,  $c(\text{KOH}) = 0,1 \text{ mol/l}$  dans du propanol 2:

Dissoudre 7 g d'hydroxyde de potassium en pastilles dans du propanol 2 et compléter à 1000 ml avec du propanol 2.

5.2.2.2/ Hydroxyde de potassium, solution titrée  $c(\text{KOH}) = 0,5 \text{ mol/l}$  dans du propanol-2:

Dissoudre 35 g d'hydroxyde de potassium en pastilles dans du propanol-2 et compléter à 1000 ml avec du propanol 2.

#### 5.2.2.3/ Etalonnage

La concentration exacte de la solution doit être déterminée immédiatement avant emploi.

Peser à 0,0002 g près, 0,15 g (pour la solution 5.2.2.1) ou 0,75 g (pour la solution 5.2.2.2) d'acide benzoïque de pureté 99,9%, l'introduire dans un bécher (5.3.2) et le dissoudre dans 50 ml de méthylisobutylcétone (5.2.1).

Introduire les électrodes du pH-mètre (5.3.4) déclencher l'agitateur (5.3.5) et titrer avec la solution d'hydroxyde de potassium (5.2.2.1 ou 5.2.2.2) jusqu'au point d'équivalence (voir note 1 en 5.5.3).

La concentration de la solution d'hydroxyde de potassium (5.2.2.1 ou 5.2.2.2) exprimée en moles par litre, est donnée par la formule :

$$\frac{1000 X m_0}{122,1 X V_0}$$

où

$m_0$  est la masse, en grammes, d'acide benzoïque utilisé pour l'étalonnage ;

$V_0$  est le volume, en millilitres, de la solution d'hydroxyde de potassium (5.2.2.1 ou 5.2.2.2) utilisé.

#### 5.3 / Appareillage

Matériel courant de laboratoire, et notamment :

##### 5.3.1 / Balance analytique

5.3.2 / Bécher, de 150 ml de capacité, forme haute.

5.3.3/ Burette, de 10 ml de capacité, graduée en 0,1 ml

5.3.4/ pH-mètre, équipé d'électrodes en verre et au calomel.

Le contact entre la solution saturée de chlorure de potassium et la solution d'essai doit être effectuée à travers une plaque de porcelaine ou de verre fritté d'au moins 3 mm d'épaisseur.



## NOTE

Il y a intérêt à conserver durant 12 h avant les titrages l'électrode en verre dans l'eau distillée ou mieux dans la méthylisobutylcétone. La sécher très doucement avec un papier filtre avant d'effectuer le mesurage. La rincer immédiatement après le dosage avec de la méthylisobutylcétone, puis avec un propanol 2, enfin avec de l'eau distillée.

Si l'électrode ne fonctionne pas de façon satisfaisante, essayer de la régénérer en la conservant durant 24 h dans une solution isopropanolique d'acide chlorhydrique à 1 mol/l. Après ce traitement, laver l'électrode à l'eau distillée, puis avec du propanol-2 et de la méthylisobutylcétone.

L'emploi de plaques de porcelaine ou de verre frittée épaisses pour assurer le contact entre la solution saturée de chlorure de potassium et la solution d'essai évite les courants de diffusion et les potentiels parasites.

## 5.3.5 / Agitateur, de préférence agitateur magnétique

## 5.4/ Echantillonnage

Prélever l'échantillon pour laboratoire conformément à la méthode officielle 11 95 00.

## 5.5/ Mode opératoire

## 5.5.1/ Préparation de l'échantillon pour essai

Préparer l'échantillon pour essai conformément à la méthode officielle n° 11 95 01.

## 5.5.2/ Prise d'essai

Dans le Bécher (5.3.2) peser à 0,01 g près, 5 à 10 g de l'échantillon pour essai.

## 5.5.3/ Détermination

Dissoudre la prise d'essai (5.5.2) dans 50 ml de méthylisobutylcétone (5.2.1).

Introduire les électrodes du pH-mètre (5.3.4), déclencher l'agitateur (5.3.5) et titrer avec la solution d'hydroxyde de potassium (5.2.2.1 ou 5.2.2.2) selon l'acidité présumée de l'échantillon, jusqu'au point d'équivalence.

## NOTES

1- Le point d'équivalence est généralement voisin de la valeur 10 lue sur l'échelle des pH et peut être déterminé graphiquement en l'identifiant sur la courbe de neutralisation au point d'inflexion.

Il est également possible de le calculer en prenant la valeur pour laquelle la dérivée première de la variation du Ph en fonction de la quantité de la solution d'hydroxyde de potassium ajoutée est maximale, ou la valeur pour laquelle la dérivée seconde s'annule.

2/ Le point d'inflexion n'est pas possible à déterminer dans le cas des huiles de coton brutes riches en gossypol.

Dans ce cas, utiliser une détermination conventionnelle du point d'inflexion arbitrairement fixé au pH du point d'équivalence de la neutralisation de l'acide oléique par l'hydroxyde de potassium dans le solvant utilisé pour le titrage, comme décrit ci-après.

Dissoudre environ 0,282 g d'acide oléique dans 50 ml de méthylisobutylcétone (5.2.1). Tracer la courbe de neutralisation de l'acide oléique par la solution d'hydroxyde de potassium (5.2.2) utilisé. Lire sur la courbe le pH du point d'inflexion (correspondant en principe à l'addition de 10 ml de solution d'hydroxyde de potassium à 0,1 mol/l). A partir de cette valeur, lire sur la courbe de neutralisation de l'huile de coton le volume de solution d'hydroxyde de potassium utilisé pour neutraliser l'huile de coton.

## 5.5.4 / Nombre de déterminations

Effectuer deux déterminations sur le même échantillon pour essai

## 6/ Expression des résultats

## 6.1/ Expression en indice d'acide

L'indice d'acide est égal à :

$$\frac{561,1XV}{m}$$

Où

56,1 : est la masse molaire, exprimée en grammes par mole, de l'hydroxyde de potassium;

V : est le volume, en millilitres, de potassium utilisé;

C : est la concentration exacte, en moles par litre, de la solution titrée d'hydroxyde de potassium utilisée ;

m : est la masse, en grammes, de la prise d'essai



Prendre comme résultat la moyenne arithmétique des deux déterminations.

#### 6.2/ Expression en acidité

L'acidité peut être calculée à partir des résultats obtenus pour la détermination de l'indice d'acide, soit par la méthode titrimétrique (chapitre 4) soit par la méthode potentiométrique (chapitre 5).

L'acidité exprimée en pourcentage en masse est égale à :

$$VXc \frac{M}{1000} \times \frac{100}{m} = \frac{VXcxM}{10Xm}$$

où :

**V**: est le volume, en millilitres, de la solution tirée d'hydroxyde de potassium utilisée ;

**C**: est la concentration exacte en moles par litre, de la solution titrée d'hydroxyde de potassium utilisé ;

**M** :est la masse molaire, en grammes par mole, de l'acide adopté pour l'expression du résultat (voir tableau 1)

**m**: est la masse, en grammes de la prise d'essai

Prendre comme résultat la moyenne arithmétique des deux déterminations.



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTRE DU COMMERCE

# METHODE D'ANALYSE

CORPS GRAS D'ORIGINES ANIMALE ET VEGETALE  
DETERMINATION DE L'INDICE DE REFRACTION

24 JUIN 1997



## 1- DEFINITION

Indice de réfraction (d'une substance) : rapport de la vitesse de la lumière à une longueur d'onde définie dans le vide à sa vitesse dans la substance.

En pratique la vitesse de la lumière dans l'air est utilisée à la place de celle dans le vide et la longueur d'onde choisie, est, sauf indication contraire celle de la moyenne des raies D du sodium (589.6 nm)

L'indice de réfraction d'une substance donnée varie avec la longueur d'onde de la lumière incidente et avec la température.

La notation est  $n_D^t$ , où  $t$  est la température en degrés celsius.

## 2- PRINCIPE

Mesurage à l'aide d'un réfractomètre convenable de l'indice de réfraction de l'échantillon liquide à une température constante.

## 3- REACTIFS

3.1 a- Bromonaphtalène, ou laurate d'éthyle, de qualité pour réfractomètre et d'indice de réfraction connu.  $CH_2(CH_2)_4$  à 20°C (ND 1.4119)

3.2- Trichloréthylène, ou autres solvants tels que hexane, éther de pétrole acétone, toluène, pour le nettoyage du prisme du réfractomètre.

## 4- APPAREILLAGE

Matériel courant de laboratoire, et notamment:

4.1- Réfractomètre, par exemple type ABBE, susceptible de déterminer l'indice de réfraction à  $\pm 0.0002$  près entre  $N_D = 1.3000$  et  $N_D = 1.7000$ .

Ce réfractomètre doit être ajuster de façon à donner, à la température de 20°C pour l'eau distillée, un indice de 1.3330.

4.2- Source de lumière: Lampe à vapeur de sodium.  
La lumière blanche peut être utilisée si le réfractomètre est équipé d'un système de compensation achromatique.

La lumière de verre, d'indice de réfraction connu.

4.4- Bain d'eau, réglable à la température à laquelle les mesures sont à effectuer (cas des échantillons solides).

## 4- ECHANTILLONNAGE

Méthode officiel n° 11 95 00, "corps gras d'origines animale et végétale" Echantillonnage.

## 5- MODE OPERATOIRE

5.1- Préparation de l'échantillon pour essai.  
Préparer l'échantillon pour essai conformément à la méthode officielle 11 95 01.  
L'indice de réfraction doit être déterminé sur le corps gras parfaitement anhydre et filtré.

Dans le cas d'un échantillon solide, transférer l'échantillon préparé dans un récipient convenable et le placer dans le bain d'eau (4.5), réglé à la température à laquelle les mesurages sont à effectuer. Laisser un temps suffisant pour que la température de l'échantillon se stabilise.

5.2- REGLAGE DE L'APPAREIL Vérifier le réglage du réfractomètre (4.1) en mesurant l'indice de réfraction de la lame de verre (4.3) selon les instructions du fabricant ou en mesurant l'indice de réfraction de l' - bromonaphtalène ou du laurate d'éthyle (3.1).

## 5.3- Détermination

Mesurer l'indice de réfraction de l'échantillon aux températures suivantes:



a) 20°C pour les corps gras complètement liquides à cette température;

b) 40°C pour les corps gras complètement fondus à cette température;

c) 50°C pour les corps gras complètement fondus à cette température mais pas à 40°C;

d) 60°C pour les corps gras complètement fondus à cette température mais pas à 50°C;

e) 80°C ou plus les autres corps gras totalement hydrogénés ou des cires.

Maintenir la température du prisme du réfractomètre à la valeur constante nécessaire au moyen d'une circulaire d'eau assurée par le bain d'eau (4.4) réglé à 0.1°C près.

Contrôler la température de l'eau sortant du réfractomètre en utilisant un thermomètre de précision convenable. Immédiatement avant le mesurage, abaisser la partie mobile du prisme en position horizontale. Essuyer la surface du prisme d'abord avec un chiffon doux, ensuite avec un tampon d'ouate mouillé par quelques gouttes de solvant (3.2).

Effectuer les mesurages conformément aux instructions opératoires de l'appareil utilisé.

Lire l'indice de réfraction à 0.0002 près en valeur absolue et noter la température du prisme de l'appareil.

Immédiatement après le mesurage, essuyer la surface du prisme avec un chiffon doux, puis avec un tampon d'ouate mouillé après quelques gouttes de solvant (3.2).

Mesurer deux autres fois l'indice de réfraction et calculer la moyenne arithmétique des trois mesurages.

#### 5.4 Nombre de déterminations

Effectuer deux déterminations sur des prises d'essai provenant du même échantillon pour essai

### 6- EXPRESSION DES RESULTATS

#### 6.1- Mode de calcul et formules

si la différence entre la température de mesurage  $t_1$  et la température de référence  $t$  est inférieure à 3°C, l'indice de réfraction  $n_D^{t_1}$  à la température de référence  $t$  est donnée par la formule:

a) Si  $t_1 > t$

$$N_D^t = N_D^{t_1} + (t_1 - t) F$$

b) Si  $t_1 < t$

$$N_D^t = N_D^{t_1} + (t - t_1) F$$

où :

$t_1$  est la température de mesurage;

$t$  est la température de référence;

$F$  est le facteur de correction, fonction de la température, égal 0.00035 pour  $t = 20^\circ\text{C}$ , pour les huiles;

0.00036 pour  $t = 40^\circ\text{C}$ ,  $t = 50^\circ\text{C}$ ,  $t = 60^\circ\text{C}$  pour les graisses concres et les mélanges d'acides gras;

0.00037 pour  $t = 80^\circ\text{C}$  ou plus, pour les cires

Prendre comme résultat la moyenne arithmétique des valeurs obtenues pour les deux déterminations (5.4) si la condition de répétabilité (5.6.2) est remplie.

Noter le résultat arrondi à la quatrième décimale.

#### NOTE

Dans l'expression des résultats, il faut tenir compte du fait que la présence d'acides gras libres abaisse fortement l'indice de réfraction.

Si l'indice d'acide est  $\geq 2$ , ajouter 0.000 045 pour unité d'indice d'acide.

#### 6.2- Répétabilité

La différence entre les valeurs obtenues pour les deux déterminations (5.4) effectuées rapidement l'une après l'autre par le même analyste ne doit pas dépasser 0.0002 unité d'indice de réfraction. Sinon, répéter les déterminations.

