

**MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEURE ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE**

Université Badji Mokhtar-Annaba



جامعة باجي مختار – عنابة

**Faculté des Sciences
Département de Biochimie
Laboratoire de Biochimie et Microbiologie Appliquées**

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT 3^{ÈME} CYCLE

Option : Biochimie appliquée

**Evaluation de la toxicité d'un insecticide carbamate
« méthomyl » chez le rat Wistar : Stress oxydant
et exploration des effets protecteurs de la
supplémentation en sélénium et/ou en vitamine C**

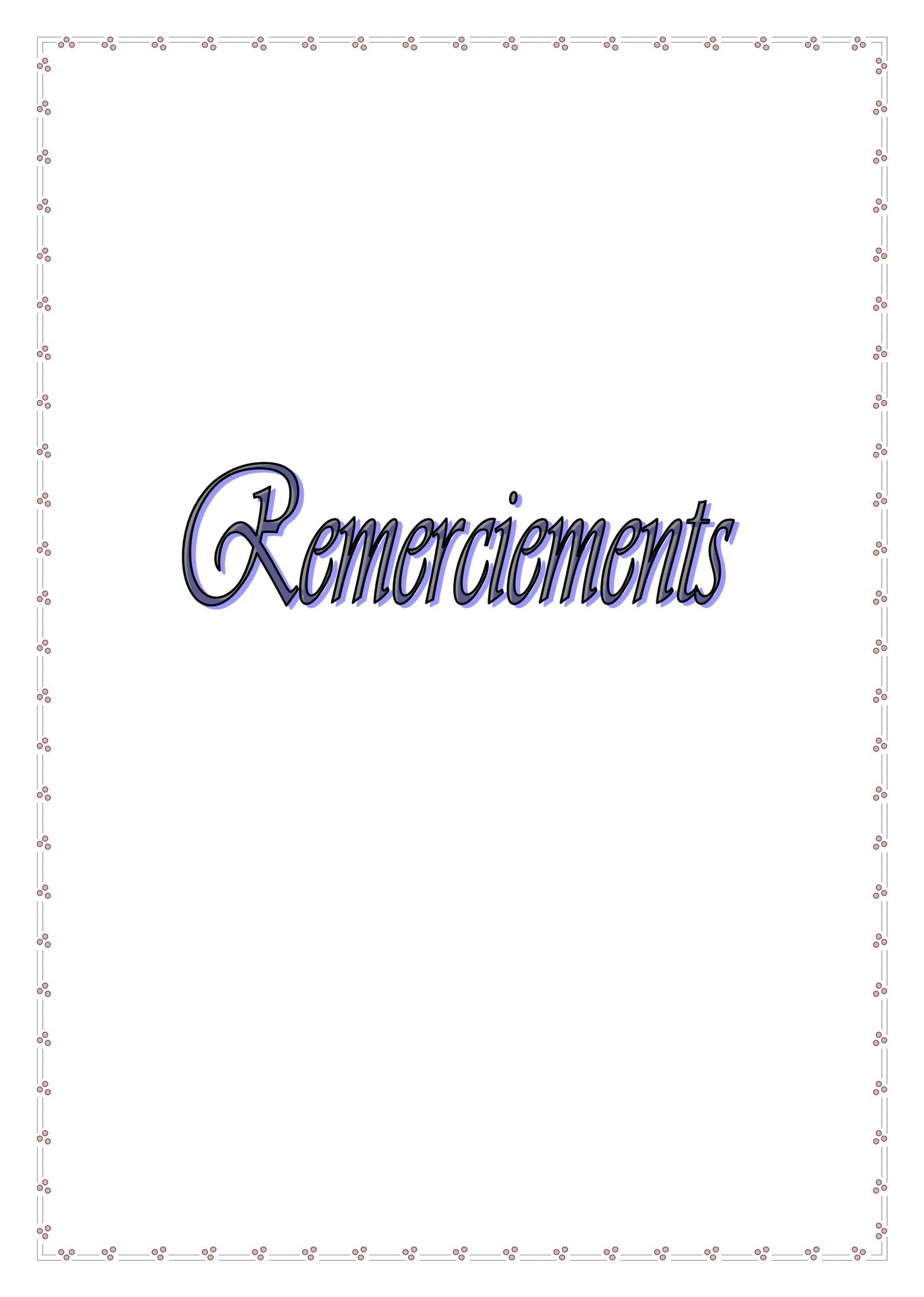
Présentée par : M^{elle} Djefal Assia

Jury composé de :

Prof. Bouzerna Noureddine, Professeur à l'université Badji Mokhtar-Annaba	Président
Prof. Abdennour Cherif, Professeur à l'université Badji Mokhtar-Annaba	Examinateur
Prof. Tadjine Aicha, Professeur à l'université Chadli Benjedid, El-Tarf	Examinatrice
Dr. Ouldjaoui Abdellah, MCA à l'université Larbi Ben m'hidi, Oum El-Bouaghi	Examinateur
Prof. Messarah Mahfoud, Professeur à l'université Badji Mokhtar-Annaba	Directeur de thèse

Année universitaire : 2013/2014

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



Remerciements

Remerciements

Ce mémoire de thèse vient finaliser 5 ans de travail. Il marque un terme à cette expérience professionnelle mais aussi personnelle qui n'aurait pas été réalisée sans le savoir et le soutien de nombreuses personnes. Je tiens ainsi à remercier en quelques lignes tous ceux qui, de près ou de loin ont contribué à ce travail, en espérant n'oublier personne et il faut trouver les mots justes. Je vais essayer de faire de mon mieux,

*Je remercie en premier lieu **ALLAH** le tout puissant pour toute la volonté et le courage qu'il m'a donné pour l'achèvement de cette thèse, il a été et sera toujours à côté de moi pour réussir à terminer n'importe quel travail.*

*Une part importante de ce travail a été réalisée au Laboratoire de Biochimie et Microbiologie Appliquée (L.B.M.A.), Université Badji Mokhtar, Annaba ; sous la responsabilité de Professeur **LADJAMA Ali**, je tiens à le remercier, pour son aide et son accueil chaleureux au laboratoire.*

*Mon respect et reconnaissance sont adressés à Monsieur **BOUZERNA Noureddine** ; professeur à l'université d'Annaba, qui ma fait l'honneur de présider le jury de soutenance.*

*Mes sincères remerciements vont à mon encadreur : Monsieur **MESSARAH Mahfoud** ; professeur à l'université d'Annaba, pour les conseils judicieux et constants qu'il m'a prodigués tout au long de ce travail, pour sa disponibilité et son indulgence qui m'ont permis de mener à bien cette étude, qu'il trouve ici l'expression de mes plus profonds respects et toutes mes gratitude.*

*J'exprime mes remerciements à Monsieur **ABDENNOUR Cherif** ; professeur à l'université d'Annaba, qui ma fait l'honneur de participer au jury de cette thèse en tant qu'examineur.*

*J'exprime mes remerciements à Madame **TADJINE Aicha** ; professeur à l'université d'El-Taref, qui ma faite l'honneur de participer au jury de cette thèse en tant qu'examinatrice.*

*J'exprime également mes remerciements à Monsieur **OULDJAOUI Abdellah** ; maître de conférence A à l'université d'Oum El-Bouaghi, qui ma fait l'honneur de participer au jury de cette thèse en tant qu'examineur.*

*Mes sincères remerciements vont à mon enseignante : Madame **MESSARAH-BOUMENDJEL Amel** ; maître de conférence A à l'université d'Annaba, pour les conseils judicieux et constants qu'il m'a prodigués tout au long de ce travail, pour ces conseils et son soutien moral qui m'ont permis de mener à bien cette étude, qu'il trouve ici l'expression de mes plus profonds respects et toutes mes gratitudees.*

*Mon respect et reconnaissance sont adressés à Monsieur le professeur **EL FEKI Abdelfattah** ; responsable de laboratoire d'écophysiologie animale (L.E.P.A.), Université de Sfax, Tunisie. Je tiens à le remercier et toute l'équipe pour leurs aides.*

*J'exprime mes vifs remerciements à tous les membres de département de biochimie à l'université d'Annaba surtout à Monsieur **TICHATI Lazher** ; technicien au laboratoire L.B.M.A., Université Badji Mokhtar, Annaba, je tiens à le remercier, pour ces aides précieuses au niveau de laboratoire.*

*Mes remerciements vont également aux doctorants **KADECHE Lilia** et **ZENNIR Rabah** et aux étudiants de Master **MAZOUZI Sofiane** et **BEKKAI Sofiane** de l'université d'Annaba, aux étudiants **BAHI Fahem** et **Aissa** et la doctorante **Kahina** de l'Université de Bejaia et aux docteurs **SAOUDI Mongi** et **GAROUI El Mouldi** de l'Université de Sfax, Tunisie pour les aides précieuses qu'ils m'ont apportés pour la réalisation de ce travail, qu'ils trouvent ici l'expression de mes plus profonds respects et toute ma gratitude.*

En fin, à tous ceux et celles qui ont contribué de près et de loin à la réalisation de ce travail qu'ils trouvent ici l'expression de ma profonde gratitude et mon remerciement.



Dédicaces

إهداء

بسم الله الرحمن الرحيم

﴿اللهم يسر لي أمري و أحل عقدة من لساني يفقهوا قولي﴾

﴿اللهم زدني علماً﴾

أهدي هذا العمل المتواضع لله رب العالمين، الذي وفقني لإتمام هذه الأطروحة، مؤنسي في وحدتي و كرتي، الرحيم بعباده و إلى رسوله الكريم « محمد صلى الله عليه و سلم » خير خلق الله، راجية أن القاه وهو راض عني.

إلى أقدس مكان على وجه الأرض، إلى مكة الغالية، أهديك هذا العمل ؛

إلى فلسطين الحبيبة وخاصة إلى غزة الجريئة ؛

إلى الذين صدقهم بلغوا المدى، إلى الذين بعزمهم هزموا العدى و إلى الذين وهبوا الحياة رخيصة أخلى هدية، إليكم يا حراس الأقصى المبارك ؛ يا جنود فلسطين : منا ألفه سلام ؛

إلى ولايتي الحبيبة ولاية عنابة ؛

إلى تونس الغالية و شعبها ؛ شكراً على الأوقات و حفاوة الاستقبال و كرم الضيافة ؛

إلى أبي و أمي، إلى أختاي زينب و خديجة و إلى أخوأي سلمان و شعيب أهدى هذا البحث متمنية أن يحفظكم الله ؛

إلى أخلى إنسانة في قلبي إلى التي تعجز الكلمات عن التعبير عنها إليك يا أحسن و أطفه و أحسن إنسانة عرفتها ؛ إلى التي وفقك بجانبى في حلوى و مربي ؛ إلى التي تنور دربي إلى رفيقة العمر إليك يا صديقتي الغالية مريم و إلى زوجك أهدى هذا العمل ؛

إلى العم الغالي " عمي محمد العربي "، الأب الثاني بالنسبة لي، شكراً على الحب، الدعم، المساعدة و الوقوف إلى جانبي في أصعب الأوقات أهديك هذا الجهد ؛

إلى جميع أفراد عائلتي جفال و بوزيان ؛

إلى عائلتي بوعنان و محديني، لي الشرف أن أكون منكم حفظكم الله، شكرا على الدعم و
الحب؛

إلى صديقتي المقربات والعزيزات على القلب، أحبكن في الله حفظكن الله لي أبد الدهر،
أشكركن على الحب، الدعم و السعادة برفقتكن، لي الشرف بأخوتكن : هاجر، إسمهان، وحيدة،
عديلة، ريم، ليليا، وفاء، صباح السعيدية، كهينة القبائلية، سارة و ليلي من تونس و إلى جميع
الأخوات و الصديقات ؛

إلى جميع الصديقات و كل الساكنين و العاملين بالإقامتين الجامعتين 2000 سرير الشعبية و
600 سرير الشلوة أشكركم على الأوقات الجميلة و الرائعة التي قضيتها بينكم و التي ستظل
محفورة في الذاكرة ؛

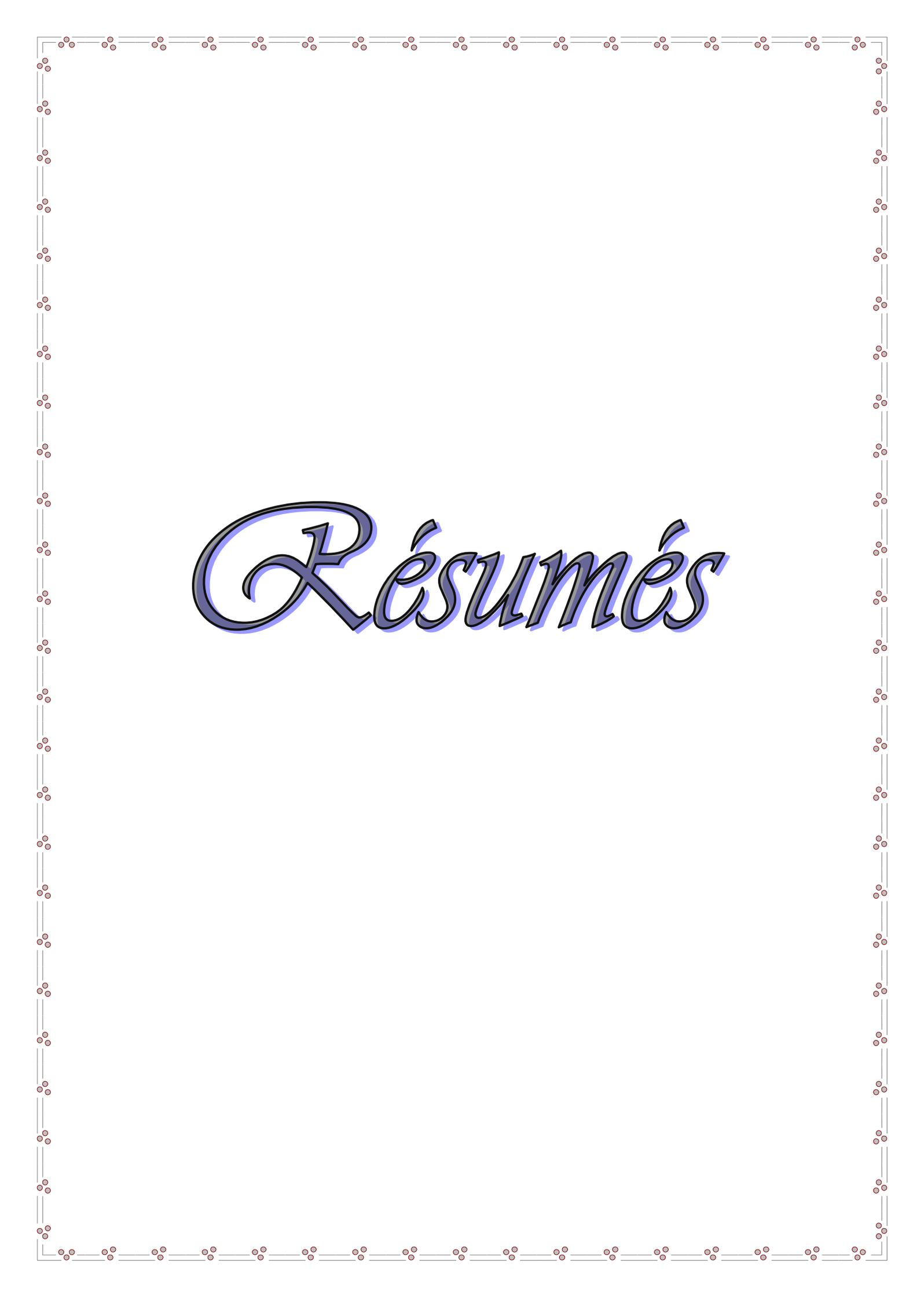
إلى كل من يسعى و يجتهد في طلب العلم ؛

إلى المؤمنين و المسلمين في كل بقاع الأرض ؛

إلى كل من يحب أسية و تحبه ؛

إلى كل من ساهم و ساعد في إنجاز هذه الأطروحة.

أسية



Résumés

Résumé

Le présent travail consiste à évaluer les effets protecteurs de la vitamine C et de sélénium à raison de 200mg/kg et de 0.6g/100g de poids corporel, respectivement sur la cytotoxicité induite par le traitement avec un insecticide carbamate « méthomyl » à 8mg/kg de poids corporel dans l'eau de boisson chez le rat Wistar.

Nos résultats ont montré que l'administration du méthomyl provoque des effets délétères au niveau de l'organisme se traduisant par ; un effet négatif sur la croissance corporelle, un effet hépatotoxique (perturbations de biomarqueurs hépatiques), néphrotoxique (augmentation de l'urée et la créatinine plasmatiques), thyroïdienne (augmentation de la thyroxine libre plasmatique) et un effet négatif cérébral (diminution de l'activité de l'enzyme acétylcholinestérase et augmentation de l'activité de l'enzyme lactate déshydrogénase). Nous avons noté que l'utilisation continue du méthomyl est à l'origine aussi de l'apparition d'un état de stress oxydant démontré par une augmentation de la peroxydation lipidique, signalée suite à une détermination des concentrations de malondialdéhyde tissulaires, des perturbations dans les systèmes de défense antioxydant, objectivées suite à une détermination des concentrations de glutathion tissulaires et certaines enzymes antioxydantes ; glutathion peroxydase, catalase et glutathion-S-transférase tissulaires.

Cependant, la supplémentation en vitamine C et/ou en sélénium aux rats traités par le méthomyl, ont atténué certains effets nocifs et toxiques de cet insecticide. Ceci met nettement en évidence les rôles protecteurs de ces deux antioxydants vis-à-vis du stress oxydant généré au cours du traitement par ce carbamate.

L'ensemble de ces résultats montre bien que l'exposition au méthomyl provoque des perturbations au niveau de l'organisme qui sont atténuées par l'utilisation de la vitamine C et le sélénium, ce qui pourrait résulter des propriétés antioxydantes de la vitamine C et du sélénium pour contracter le stress oxydant induit par le méthomyl.

Mots clé : Méthomyl, Cytotoxicité, Stress oxydant, Antioxydants, Vitamine C, Sélénium, Rats.

Abstract

The present study was undertaken to evaluate the protective effect of vitamin C (200mg/kg b.w.) and selenium (0.6g/100g b.w.) against cytotoxicity induced by an insecticide carbamate “methomyl” (8mg/kg b.w.) administered in drinking water in wistar rats.

Our results showed that the administration of methomyl causes deleterious effects on the organism resulting in a negative effect on growth and production performances. The body growth, hepatotoxic effect (disturbances in the hepatic biomarkers), nephrotoxic effect (increase in plasmatic urea and creatinin), thyroid toxicose effect (increase in the plasmatic free thyroxin) and a cerebral negative effect (reduction in acetylcholinesterase activity and increase in lactate dehydrogenase activity). We noted that continued use of methomyl is also at the origin of the appearance of oxidative stress shown by an increase in lipid peroxidation, announced following a determination of the tissues concentrations of malondialdehyde, disturbances in antioxidant defense systems, by the determinations of tissues glutathione level and some antioxidants enzymes such as tissues glutathione peroxidase, catalase and glutathione S-transferase activities.

However, the supplementations by the vitamin C and/or selenium to rats treated by methomyl mitigated some harmful and toxic effects of this insecticide. This clearly highlights the protective roles of these two antioxidants to accentuate the oxidative stress generated during the treatment by this carbamate. Furthermore, simultaneous supplementation with vitamin C and/or Se restored these parameters partially.

In conclusion, the results of the current study revealed that MET-induced toxicity caused perturbations of some biochemical parameters, lipid peroxidation and alterations in the antioxidant enzymes in liver and kidney homogenates. Administration of vitamin C and Se exhibited protective effect by inhibiting MET-induced toxicity in rats.

Key words: Methomyl, Cytotoxicity, Oxidative Stress, Antioxidants, Vitamin C, Selenium, Rats.

المخلص

يهدف هذا العمل إلى تقييم الأثار الوقائية لفيتامين C والسلينيوم بجرعة 200 مغ/كغ و 0.6غ/100غ وزن حي، على الترتيب على التسمم الخلوي الناجم عن المعاملة بمبيد الحشرات الميتوميل الذي ينتمي الى عائلة الكربامات بتركيز 8 مغ/كغ وزن حي في ماء الشرب عند فئران التجارب.

بينت النتائج المتحصل عليها بأن المعاملة بالميتوميل قد أدت إلى العديد من التأثيرات السلبية في العضوية و التي تتمثل في تأثير سلبي على النمو(انخفاض في الوزن الحي عند الفئران)، تسمم كبدي (اختلال في المعايير البيولوجية الكبدية)، تسمم كلوي (زيادة تركيز كل من اليوريا و الكرياتينين البلازمي)، تسمم في الغدة الدرقية (زيادة مستوى التيروكسين الحر البلازمي) و تأثير سلبي دماغي (انخفاض نشاط أنزيم acetylcholinestérase وزيادة نشاط أنزيم lactate déshydrogénase). كما سجلنا بأن الاستعمال المتواصل للميتوميل تسبب في ظهور حالة الاجهاد التأكسدي متمثلة في زيادة مستوى فوق الأكسدة الليبيدية و ذلك من خلال تحديد تركيز MDA في الأنسجة واختلال في أنظمة الوقاية ضد الأكسدة و ذلك من خلال تحديد تركيز الجلوتاثيون و عمل بعض أنزيمات مضادات الأكسدة؛ GST, CAT, GPx في الأنسجة.

في حين أن المعالجة بفيتامين C والسلينيوم عند الفئران المعاملة بالميتوميل أدت إلى التخفيف من بعض مؤثراته الضارة و السامة. مما يدل بوضوح على الأدوار الوقائية لضادي الأكسدة ضد الاجهاد التأكسدي الناتج عن المعاملة بمبيد الحشرات.

بينت مجمل هذه النتائج بوضوح أن التعرض للميتوميل يؤدي إلى حدوث اضطرابات في العضوية و التي نقصت باستعمال فيتامين C و السلينيوم مما يدل على قدرتهما كمضادات للأكسدة على التقليل من الاجهاد التأكسدي.

الكلمات الدالة : ميتوميل، تسمم خلوي، الاجهاد التأكسدي، مضادات الأكسدة، فيتامين C ، سلينيوم، فئران.

LISTE DES FIGURES

Figure	Titre	Page
1	Modes d'exposition de l'homme aux pesticides	06
2	Structure de base de l'acide carbamique	07
3	Mécanisme d'action des insecticides carbamates	08
4	Structure chimique du méthomyl	09
5	Voie métabolique proposée au méthomyl chez les mammifères	13
6	Cascade de production des principales ERO	21
7	Oxydation au sens large du glucose ou « Glycosoxydation », selon les 2 voies principales	24
8	Stratégies de lutte des antioxydants contre les causes et les conséquences du stress oxydant	25
9	Exemples d'affections rencontrées chez l'homme causées par les ERO, classées par organe cible	31
10	Acide L-ascorbique	33
11	Voie métabolique de l'ascorbate	35
12	Schéma montre le recyclage de l'ascorbate pendant le processus de scavenging des RLs	37
13	Métabolisme des espèces sélénées chez l'homme	45
14	Le cycle catalytique de GPx	47
15	Effets bénéfique du sélénium sur la santé	49
16	Schéma récapitulatif du protocole expérimental	53
17	Principe du dosage du malondialdéhyde	71
18	Principe de dosage du glutathion	73
19	La courbe d'étalonnage utilisé (BSA 1 mg/ml) pour le dosage des protéines.	78
20	Variation du poids corporel final (g) des rats témoins et traités après 3 semaines du traitement	83
21	Variation du poids relatif (g/100g) du foie chez les rats témoins et traités après 3 semaines du traitement	85
22	Variation du poids relatif (g/100g) des reins chez les rats témoins et traités après 3 semaines du traitement	86
23	Variation de la concentration plasmatique en glucose (g/l) chez les rats témoins et traités après 3 semaines du traitement	72
24	Variation de la concentration plasmatique en bilirubine directe (g/l) chez les rats témoins et traités après 3 semaines du traitement	72
25	Variation de la concentration plasmatique en cholestérol (g/l) chez les rats témoins et traités après 3 semaines du traitement	93
26	Variation de la concentration plasmatique en triglycérides (g/l) chez	93

les rats témoins et traités après 3 semaines du traitement		
27	Variation de la concentration plasmatique en protéines totales (g/dl) chez les rats témoins et traités après 3 semaines du traitement	94
28	Variation de la concentration plasmatique en lipides totaux (mg/dl) chez les rats témoins et traités après 3 semaines du traitement	94
29	Variation de l'activité enzymatique de l'ASAT (UI/l) chez les rats témoins et traités après 3 semaines du traitement	95
30	Variation de l'activité enzymatique de l'ALAT (UI/l) chez les rats témoins et traités après 3 semaines du traitement	95
31	Variation de l'activité enzymatique de la PAL (UI/l) chez les rats témoins et traités après 3 semaines du traitement	96
32	Variation de l'activité enzymatique de la LDH (UI/l) chez les rats témoins et traités après 3 semaines du traitement	96
33	Histologie du foie chez les rats témoins et traités	98
34	Variation de la concentration plasmatique en urée (g/l) chez les rats témoins et traités après 3 semaines du traitement	107
35	Variation de la concentration plasmatique en créatinine (mg/dl) chez les rats témoins et traités après 3 semaines du traitement	107
36	Variation du poids relatif de la thyroïde en (g/100g) chez les rats témoins et traités après 3 semaines du traitement	111
37	Variation de la concentration plasmatique en FT4 (ng/dl) chez les rats témoins et traités après 3 semaines du traitement	112
38	Variation du taux en malondialdéhyde (nmol/mg prot) dans le foie et les reins chez les rats témoins et traités pendant 3 semaines du traitement	117
39	Variation du taux en malondialdéhyde (nmol/mg prot) dans le cerveau et les érythrocytes chez les rats témoins et traités pendant 3 semaines du traitement	118
40	Variation de la teneur cellulaire en glutathion (nmol/mg prot) dans le foie et les reins chez les rats témoins et traités pendant 3 semaines du traitement	119
41	Variation de la teneur cellulaire en glutathion dans le cerveau et les érythrocytes chez les rats témoins et traités pendant 3 semaines du traitement	120
42	Variation de l'activité enzymatique de la glutathion peroxydase (nmol GSH/mg prot) dans le foie et les reins chez les rats témoins et traités pendant 3 semaines du traitement	124
43	Variation de l'activité enzymatique de la glutathion peroxydase (nmol GSH/mg prot) dans le cerveau et les érythrocytes chez les rats témoins et traités pendant 3 semaines du traitement	125
44	Variation de l'activité enzymatique de la catalase ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{min/mg prot}$) dans le foie et les reins chez les rats témoins et traités pendant 3 semaines du traitement	126

45	Variation de l'activité enzymatique de la catalase ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{min}/\text{mg}$ prot) dans le cerveau et les érythrocytes chez les rats témoins et traités pendant 3 semaines du traitement	127
46	Variation de l'activité enzymatique de la glutathion S-transférase (nmol C-DNB/min/mg prot) dans le foie et les reins chez les rats témoins et traités pendant 3 semaines du traitement	127
47	Variation de l'activité enzymatique de la glutathion S-transférase (nmol C-DNB/min/mg prot) dans le cerveau et les érythrocytes chez les rats témoins et traités pendant 3 semaines du traitement	129
48	Variation du poids relatif (g/100g) du cerveau chez les rats témoins et traités après 3 semaines du traitement	138
49	Variation de l'activité enzymatique de l'acétylcholinestérase ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ prot) dans le cerveau et le plasma chez les rats témoins et traités pendant 3 semaines du traitement	140
50	Variation de l'activité enzymatique de lactate déshydrogénase (U/L) dans le cerveau et les érythrocytes chez les rats témoins et traités pendant 3 semaines du traitement	142

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Titre	Page
1	Propriétés physicochimiques du méthomyl	10
2	Valeurs de la toxicité aiguë du méthomyl chez les mammifères	14
3	Principales espèces réactives oxydantes (ERO) organiques	18
4	Principales formes chimiques des composés naturels séléniés	41
5	Variation de poids corporel (PC) (g) chez les rats témoins et traités après 3 semaines du traitement	82
6	Consommation de l'aliment et de l'eau de boisson quotidiens chez les rats témoins et traités après 3 semaines du traitement	83
7	Variation de poids absolu (PA) (g) et relatif (PR) (g/100g de PC) du foie et des reins chez les rats témoins et traités après 3 semaines du traitement	84
8	Variation de quelques biomarqueurs plasmatiques de la fonction hépatique chez les rats témoins et traités après 3 semaines du traitement	88
09	Variation de la concentration plasmatique en urée et créatinine chez les rats témoins et traités après 3 semaines du traitement	106
10	Variation des poids absolu (PA) (g) et relatif (PR) (g/100g de PC) de la thyroïde chez les rats témoins et traités après 3 semaines du traitement	110
11	Variation de la concentration plasmatique en thyroxine libre (ng/dl) chez les rats témoins et traités après 3 semaines du traitement	112
12	Variation de malondialdéhyde (nmol/mg prot) et du glutathion réduit (nmol/mg prot) au niveau du foie, reins, cerveau) et dans les érythrocytes chez les rats témoins et traités après 3 semaines du traitement	115
13	Activité enzymatique de la GPx (nmol GSH/mg prot), la CAT (μ mol H ₂ O ₂ /min/mg de prot) et la GST (nmol C-DNB/min/mg prot) au niveau de foie, reins, cerveau et dans les érythrocytes chez les rats	121

témoins et traités après 3 semaines du traitement		
14	Variation de poids absolu (PA) (g) et relatif (PR) (g/100g de PC) du cerveau chez les rats témoins et traités après 3 semaines du traitement	137
15	Variation de l'activité de l'acétylcholinestérase ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ prot) au niveau cérébrale et plasmatique chez les rats témoins et traités après 3 semaines du traitement	138
16	Variation de l'activité de lactate déshydrogénase (U/L) au niveau cérébrale et érythrocytaire chez les rats témoins et traités après 3 semaines du traitement	141

LISTE DES ABREVIATIONS

Enzymes/ions/substances :

AcCoA	:	Acétyle coenzyme A
ACh	:	Acétylcholine
AChE	:	Acétylcholinestérase
AGPI	:	Acide gras polyinsaturé
CAT	:	Catalase
CL₅₀	:	Concentration létale 50
Cu²⁺	:	Ion cuivre
DL₅₀	:	Dose létale 50
ERO	:	Espèces Réactives Oxydantes
Fe	:	Fer
Fe²⁺	:	Ion fer
GPx	:	Glutathion peroxydase
GSH	:	Glutathion réduit
GSSG	:	Disulfure de glutathion (Glutathion oxydé)
GST	:	Glutathion S-transférase
H₂O	:	Eau
H₂O₂	:	Peroxyde d'hydrogène
LOO[•]	:	Radical peroxyde
LPO	:	Peroxydation lipidique
MDA	:	Malondialdéhyde
MET	:	Méthomyl
[•]NO	:	Oxyde nitrique ou monoxyde d'azote
O₂	:	Oxygène
O₂^{•-}	:	Anion superoxyde
¹O₂	:	Oxygène singulet
O₃	:	Ozone
[•]OH	:	Radical hydroxyle

ONOO	:	Peroxynitrite
R[•]	:	Radical d'acide gras
RH	:	Acide gras
RO	:	Alcoxyle
ROO	:	Peroxyle
ROO[•]	:	Radical peroxyde
ROOH	:	Hydroperoxyde
RNS	:	Reactive Nitrogen Species
Se	:	Sélénium
SOD	:	Superoxyde dismutase
Vit C	:	Vitamine C

Unités

°C	:	Degré Celsius
dl	:	Décilitre
g	:	Gramme
g/l	:	Gramme / litre
l	:	Litre
mg	:	Milligramme
mg/dl	:	Milligramme / décilitre
min	:	Minute
mm	:	Millimètre
mol	:	Mole
U/l	:	Unité internationale / litre
µl	:	Microlitre

Divers :

e⁻	:	Electron
n	:	Nombre



Sommaire

SOMMAIRE

RESUMES

LISTE DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

LISTE DES ABREVIATIONS

INTRODUCTION GENERALE..... 01

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I : LES INSECTICIDES CARBAMATES (I.C.)

1. GENERALITES SUR LES PESTICIDES	04
1.1. Définition du terme « pesticide »	04
1.2. Classification des pesticides.....	04
1.3. Possibles modes d'expositions de l'homme aux pesticides	05
2. LES INSECTICIDES CARBAMATES (I.C.).....	06
2.1. Nature chimique des insecticides carbamates	07
2.2. Mécanisme d'action des insecticides carbamates	07
2.3. Cinétique des insecticides carbamates	08
2.4. Toxicité des insecticides carbamates.....	08
2.5. Traitement de la toxicité des insecticides carbamates.....	09
3. UN INSECTICIDE CARBAMATE : LE METHOMYL (MET)	09
3.1. Nature chimique du méthomyl.....	09
3.2. Identité et propriétés physicochimique du méthomyl	10
3.3. Propriétés biologiques du méthomyl	11
3.3.1. Mode d'action	11
3.3.2. Utilisation	11

3.3.3. Efficacité.....	11
3.4. Sources d'exposition environnementale et humaine	11
3.5. Cinétique et métabolisme du méthomyl chez les animaux de laboratoire.....	12
3.6. Effets toxicologiques du méthomyl	13
3.7. Insecticides carbamates, méthomyl et stress oxydant.....	16

Chapitre II : STRESS OXYDATIF

1. DEFFINITION DU STRESS OXYDATIF	17
2. ESPECE REACTIVES OXYDANTES (ERO)	17
2.1. Définition.....	17
2.2. Formation des espèces réactives oxydantes (ERO)	18
2.3. Rôles physiologiques des espèces réactives oxydantes	21
2. MECANISME D'ACTION DES ESPECES REACTIVES OXYDANTES	21
3.1. Les cibles lipidiques	21
3.2. Les cibles non lipidiques	23
a - Oxydation des protéines	23
b - Oxydation des glucides.....	23
c - Altérations des acides nucléiques	24
4. ANTIOXYDANTS.....	25
4.1. Antioxydants enzymatiques.....	26
4.1.1. Les superoxydes dismutases (SOD).....	26
4.1.2. Les glutathions peroxydases (GPx)	26
4.1.3. La catalase (CAT).....	27
4.2. Antioxydants non enzymatiques	27
4.2.1. Antioxydants non enzymatiques liposolubles	27
4.2.2. Antioxydants non enzymatiques hydrosolubles	28
4.2.3. Oligoéléments	30
4.2.4. Polyphénols.....	30
4.3. Risques des antioxydants	30
5. IMPLICATION DU STRESS OXYDANT DANS LES PATHOLOGIES	31

Chapitre III : VITAMINE C

1. Propriétés physicochimiques	32
2. Propriétés oxydo-réductrices et stabilité.....	33
3. Les sources de la vitamine C.....	34
4. Le métabolisme de la vitamine C.....	34
5. Les rôles physiologiques de la vitamine C	36
5.1. Fonction enzymatiques	36
5.2. Rôle antioxydant	36
5.3. D'autres rôles	38
6.3. Carence en vitamine C.....	38
7. Toxicité de la vitamine C.....	39

Chapitre IV : SELENIUM

1. Propriétés physicochimiques et les variétés du sélénium.....	40
2. Usages industriels du sélénium	42
3. Les sources du sélénium.....	42
4. Le métabolisme du sélénium.....	43
5. Les rôles physiologiques du sélénium	46
5.1. Sélénoprotéines.....	46
5.2. Rôle détoxifiant.....	48
5.3. D'autres rôles	48
6. Carence en sélénium	49
7. Toxicité du sélénium.....	50

ETUDE EXPERIMENTALE**MATERIEL ET METHODES**

I. TRAITEMENT DES RATS	51
------------------------------	----

1.1. Matériel biologique	51
1.2. Traitement des rats.....	51
II. PRELEVEMENTS DES ECHANTILLONS	52
2.1. Prélèvement sanguin.....	52
2.2. Prélèvement des organes.....	52
III. TECHNIQUES DE DOSAGE.....	54
3.1. Exploration de la fonction hépatique	54
3.1.1. Dosage du glucose sanguin	54
3.1.2. Dosage de la bilirubine directe plasmatique	55
3.1.3. Dosage du cholestérol plasmatique	56
3.1.4. Dosage des triglycérides plasmatiques	58
3.1.5. Dosage des lipides totaux plasmatiques	60
3.1.6. Dosage des transaminases plasmatiques	61
a- Dosage de l'aspartate aminotransférase (ASAT).....	61
b- Dosage de l'alanine aminotransférase (ALAT)	62
3.1.7. Dosage de la phosphatase alcaline (PAL) plasmatique	63
3.1.8. Dosage de lactate déshydrogénase (LDH) plasmatique.....	64
3.1.9. Dosage des protéines totales plasmatiques	66
3.2. Exploration de la fonction rénale	67
3.2.1. Dosage de l'urée plasmatique.....	67
3.2.2. Dosage de la créatinine plasmatique	68
3.3. Exploration de la fonction thyroïdienne (Thyroxine libre (FT4) plasmatique).....	70
3.4. Exploration du stress oxydant.....	70
3.4.1. Préparation de l'homogénat	70
3.4.2. Détermination de la peroxydation lipidique (LPO) par le taux de malonedialdéhyde (MDA) au niveau tissulaire.....	71
3.4.3. Détermination du taux de glutathion réduit (GSH) au niveau tissulaire	72
3.4.4. Détermination de l'activité de quelques enzymes antioxydantes au niveau tissulaire.....	74

a - Dosage de l'activité de la glutathion peroxydase (GPx)	74
b - Dosage de l'activité de la glutathion S-transférase (GST).....	75
c - Dosage de l'activité de la catalase (CAT).....	76
3.4.5. Dosage des protéines totales au niveau tissulaire	77
3.5. Détermination de l'activité de l'acétylcholinestérase (AChE) et de lactate déshydrogénase (LDH).....	78
3.5.1. Dosage de l'activité de l'acétylcholinestérase (AChE).....	78
3.5.2. Dosage de lactate déshydrogénase (LDH).....	79
IV- TECHNIQUE HISTOLOGIQUE	79
V- PRESENTATION DES RESULTATS ET ANALYSES STATISTIQUES	81

RESULTATS ET DISCUSSIONS

Chapitre I: IMPACT DU METHOMYL SUR QUELQUES PARAMETRES PHYSIOLOGIQUES : EFFETS PROTECTEURS DE LA SUPPLEMENTATION EN SELENIUM ET/OU EN VITAMINE C

1. Action sur la croissance corporelle	82
2. Variation de la consommation quotidienne de l'aliment et de l'eau de boisson.....	83
3. Action sur les poids absolu et relatif de certains organes	84
❖ Discussion.....	86

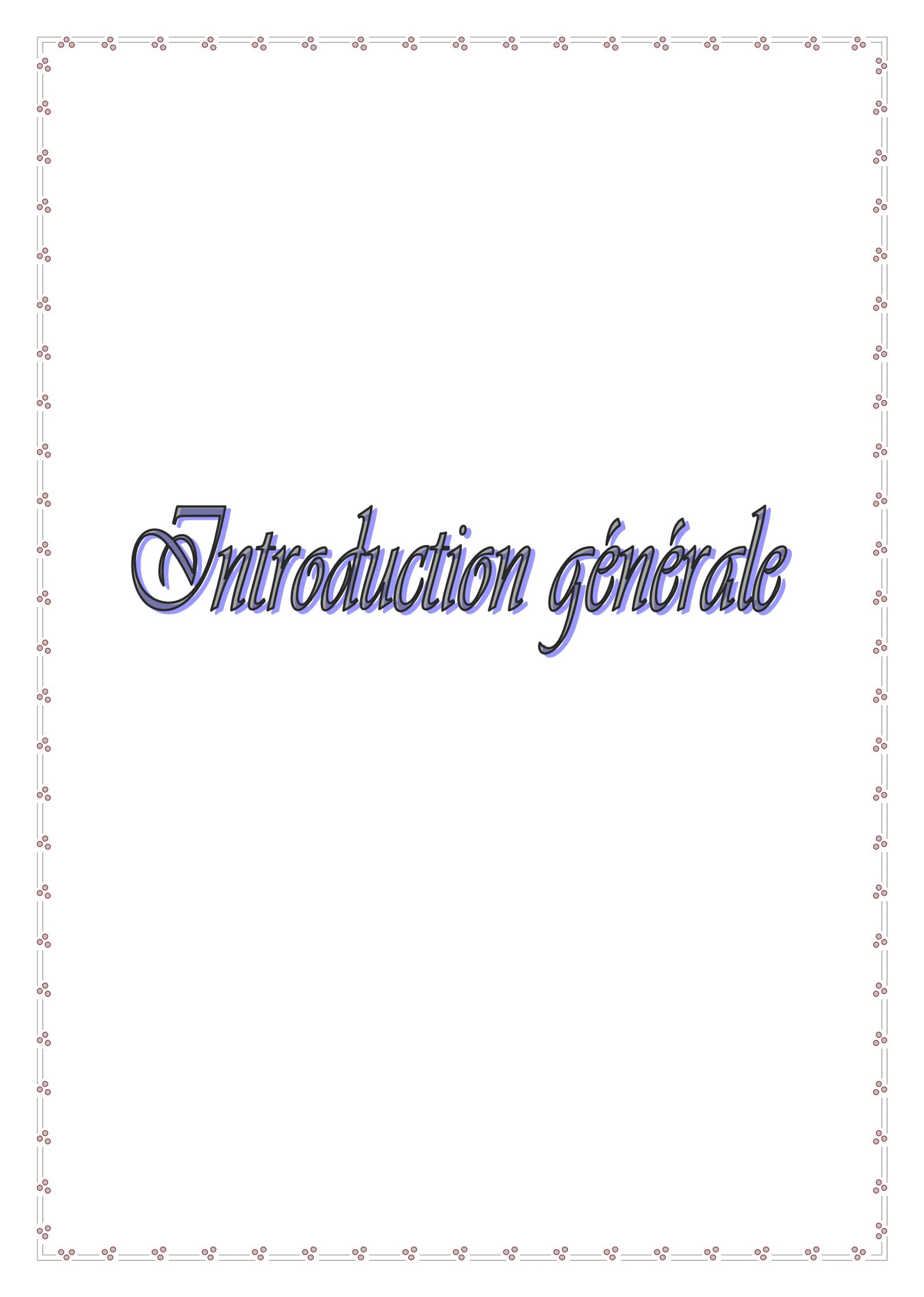
Chapitre II: HEPATOTOXICITE INDUITE PAR LE METHOMYL : EFFETS PROTECTEURS DE LA SUPPLEMENTATION EN SELENIUM ET/OU EN VITAMINE C

1. Action sur certains biomarqueurs sanguins de la fonction hépatique	88
2. Impact sur l'histoarchitecture du foie	98
❖ Discussion.....	99

Chapitre III: NEPHROTOXICITE INDUITE PAR LE METHOMYL : EFFETS PROTECTEURS DE LA SUPPLEMENTATION EN SELENIUM ET/OU EN VITAMINE C

1. Action sur la variation de la concentration plasmatique en urée et créatinine	106
--	-----

❖ Discussion.....	108
Chapitre IV : IMPACT DU METHOMYL SUR LA FONCTION TYROIDIENNE : EFFETS PROTECTEURS DE LA SUPPLEMENTATION EN SELENIUM ET/OU EN VITAMINE C	
1. Action sur les poids absolu et relatif de la thyroïde.....	110
2. Effet sur la thyroxine libre plasmatique (FT4)	111
❖ Discussion.....	113
Chapitre V : STRESS OXYDANT INDUIT PAR LE METHOMYL : EFFETS PROTECTEURS DE LA SUPPLEMENTATION EN SELENIUM ET/OU EN VITAMINE C	
1. Effet sur les taux du malondialdéhyde et du glutathion réduit tissulaires	115
2. Effet sur l'activité de quelques enzymes antioxydantes tissulaires	121
❖ Discussion.....	130
Chapitre VI : IMPACT DU METHOMYL SUR L'ACTIVITE DE L'ACETYLCHOLINESTERASE ET DE LACTATE DESHYDROGENASE : EFFETS PROTECTEURS DE LA SUPPLEMENTATION EN SELENIUM ET/OU EN VITAMINE C	
1. Action sur les poids absolu et relatif du cerveau.....	137
2. Effet sur l'activité de l'acétylcholinestérase au niveau cérébrale et plasmatique ..	138
3. Effet sur l'activité de lactate déshydrogénase au niveau cérébrale et érythrocytaire .	
.....	141
❖ Discussion.....	143
<hr/>	
CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES	145
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	148
ACTIVITES DE RECHERCHES	
Article	
Communications nationales	
Communications internationales	



Introduction générale

INTRODUCTION GENERALE

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

Les pesticides constituent un enjeu important pour la qualité de notre alimentation et de notre environnement. Ils sont aujourd'hui au cœur d'une problématique d'ordre aussi bien environnementale, avec une contamination de la faune et de la flore, que sanitaire. En effet, de part leurs propriétés toxiques, les pesticides représentent un réel danger pour l'homme lorsqu'ils ne sont pas utilisés dans des conditions appropriées.

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

Parmi les pesticides usuels, les carbamates sont largement utilisés en agriculture (Meister, 1991), le *méthomyl* (MET), un insecticide carbamate utilisé partout dans le monde sur toutes sortes de cultures. Il sert notamment à protéger les fruits, les vignes, le houblon, les légumes, les céréales, le soja, le coton et les plantes ornementales. A l'intérieur des bâtiments, on l'utilise aussi pour détruire les mouches dans les animaleries et les laiteries (Bonatti et al., 1994 ; IPCS, 1996). Toutefois, l'utilisation intensive de ce composé a entraîné de graves problèmes environnementaux et des risques pour la santé humaine vue leur hydrosolubilité et leur toxicité élevées (EFSA, 2008 ; Tomlin, 2009).

Pendant ces deux décennies, la recherche toxicologique s'est concentrée sur l'induction du stress oxydant (SO) après l'exposition aux pesticides comme mécanisme possible de la toxicité. Suite à plusieurs études, les pesticides notamment les carbamates, avec de telles propriétés, ont été montrés pour causer la surproduction d'espèces réactives oxygénées (ERO) dans les espaces intra et extracellulaires, ayant pour résultat la perturbation d'équilibre prooxydant/antioxydant cellulaires induisant de ce fait un état de stress oxydant. Quand la formation de ces ERO surpasse la capacité de balayage par les défenses

antioxydantes, les radicaux libres nocifs accumulent et augmentent la probabilité des dommages oxydants aux biomolécules critiques tels que les enzymes, les protéines, les lipides membranaires et l'ADN.

La toxicité des carbamates est principalement due, selon Fukuto et Ecobichon (Fukuto, 1990 ; Ecobichon, 2001), à l'inhibition de l'activité de l'acétylcholinestérase (AChE), enzyme impliquée dans la régulation de la neuro-transmission, par hydrolyse du neurotransmetteur l'acétylcholine (ACh). Toutefois, des études récentes ont montré que le stress oxydant pourrait être impliqué dans le mécanisme de toxicité des carbamates. En effet, ces composés peuvent induire un stress oxydant entraînant la génération des radicaux libres et l'altération du statut antioxydant (Kamboj et *al.*, 2008 ; Gupta et *al.*, 2009 ; Maran et *al.*, 2009 ; Ozden et *al.*, 2009 ; Rai et *al.*, 2009 ; Maran et *al.*, 2010 ; Mohamadin et *al.*, 2010). Plusieurs organes pourraient être affectés par l'intoxication aux carbamates à savoir le cerveau (Kamboj et *al.*, 2006 ; Rai et Sharma, 2007), le système reproducteur (Baligar et Kaliwal, 2002 ; Al-Amoudi, 2012 ; Almasiova et *al.*, 2012), le cœur (Yarsan et *al.*, 1999), les reins (Yarsan et *al.*, 1999 ; Ozden et *al.*, 2009) et le foie (Ksheerasagar et Kaliwal, 2006 ; Ozden et *al.*, 2009 ; Gbadegesin et *al.*, 2014).

De ce fait, de nombreuses enquêtes épidémiologiques ont montré l'importance d'augmenter le pouvoir antioxydant de l'organisme avec les antioxydants exogènes comme les vitamines, les caroténoïdes, les oligoéléments et les minéraux (Berkson, 1999 ; Bowrey et *al.*, 1999 ; Hemila et Douglas, 1999 ; Porter et *al.*, 1999 ; Bulger, 2001 ; Clermont et *al.*, 2001 ; Agrawal et Sharma, 2010).

Les antioxydants vitaminiques peuvent empêcher la formation non contrôlée des radicaux libres ou leur réaction aux sites biologiques et également leur destruction pour prévenir l'oxydation des antioxydants endogènes principalement par le balayage et la réduction de ces molécules. La vitamine C, en tant d'antioxydant hydrosoluble majeur, est rapporté à neutraliser les ERO et réduire les dommages oxydants.

Les oligoéléments sont le plus souvent des composés structuraux et des cofacteurs des protéines et de plusieurs enzymes en particulier celles impliquées dans les défenses antiradicalaires. Le sélénium, en tant d'oligoélément nécessaire pour maintenir la santé humaine, est rapporté à avoir la capacité de contrecarrer les radicaux libres et de protéger les macromolécules contre les dommages oxydants.

Nous avons choisi pour notre étude deux antioxydants, la vitamine C et le sélénium, à cause de leur large répartition dans les pays d'Afrique du nord et leur grande utilisation en médecine populaire.

Concernant le statut redox cellulaire, aucune étude, à notre connaissance, n'a été réalisée sur les effets protecteurs de **sélénium** et de la **vitamine C** chez des rats soumis à l'intoxication par **le méthomyl**.

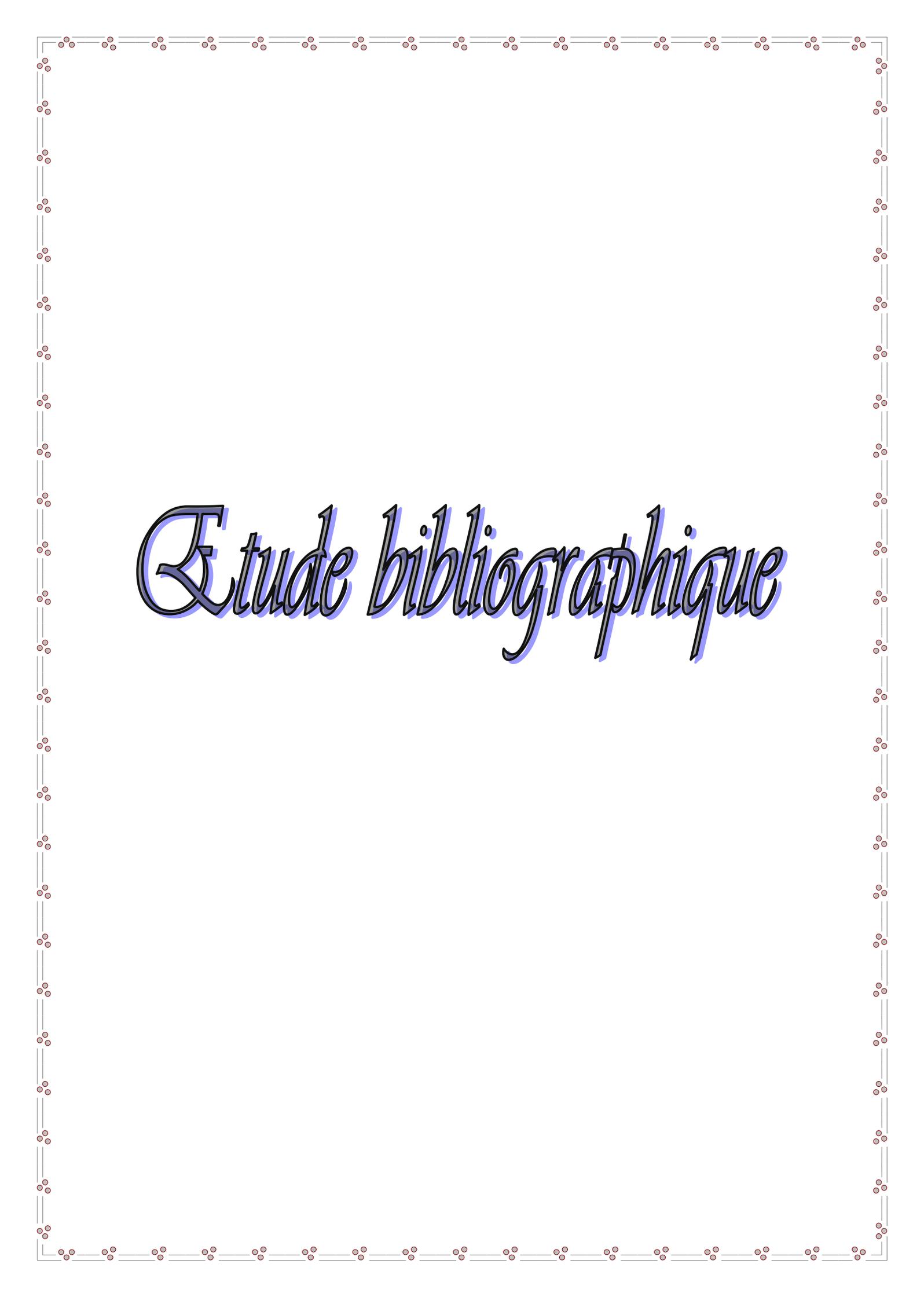
C'est ainsi que nous nous sommes intéressés à entreprendre ce travail qui a pour objectif d'étudier le stress oxydant induit par un insecticide carbamate ; le méthomyl chez le rat et de tester les effets modulateurs de deux antioxydants ; le sélénium et la vitamine C.

Cette étude est subdivisée en deux parties essentielles, la première partie présente une synthèse bibliographique dans laquelle nous apportons un premier chapitre qui consiste à étudier des généralités sur les insecticides carbamates et leur toxicité, un second chapitre qui traite les effets du stress oxydant sur les macromolécules (lipides, protéines, polysaccharides et acides nucléiques) et les mécanismes de défense contre ce stress. Le troisième et le quatrième chapitres, sont consacrés à l'étude de la vitamine C et le sélénium, respectivement.

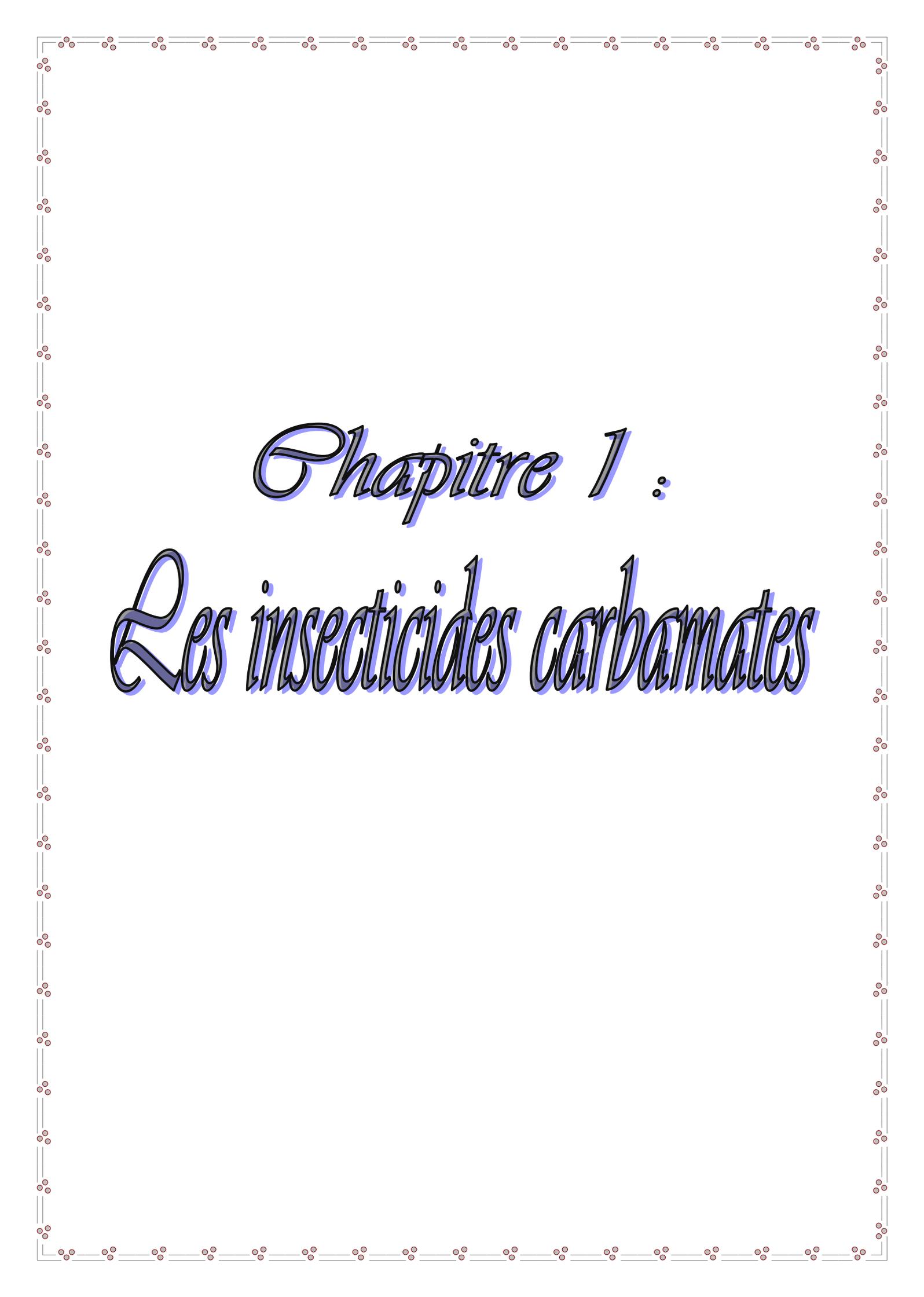
La deuxième partie expérimentale, répartie en six chapitres dans cette thèse, consiste à analyser les effets modulateurs de la supplémentation en sélénium et/ou en vitamine C sur le stress oxydant induit par le méthomyl au niveau de certains organes mous notamment le cerveau, les reins, la thyroïde et le foie. L'influence des différents traitements ont été analysés par :

- ✓ L'évaluation de certains paramètres physiologiques chez les rats Wistar ;
- ✓ L'évaluation de certains paramètres biochimiques et métaboliques ;
- ✓ L'exploration du profil du stress oxydant hépatique, rénal, cérébral et érythrocytaire ;
- ✓ La détermination de la concentration des hormones thyroïdiennes ;
- ✓ L'évaluation de l'activité enzymatique de l'acétylcholinestérase et de lactate déshydrogénase cérébral.

Et enfin, nous discuterons l'ensemble de résultats obtenus dans ce manuscrit, et on suggère quelques perspectives à ce travail de recherche.



Etude bibliographique



Chapitre 1 :
Les insecticides carbamates

LES INSECTICIDES CARBAMATES (I.C.)

1. GENERALITES SUR LES PESTICIDES

1.1. Définition du terme « pesticide »

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

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

1.2. Classification des pesticides

La classification de toutes les matières actives dépend de divers critères. L'hétérogénéité de ce vaste ensemble de produits rend difficile toute classification, certains auteurs séparent les pesticides minéraux de pesticides organiques (organochlorés et organophosphorés), d'autres préfèrent classer les produits selon la cible visée (insecticides, herbicides, fongicides, etc.), le domaine d'utilisation, leur toxicité, il y a alors plusieurs possibilités de classification, mais les deux systèmes de classification les plus utilisés sont le groupe chimique auquel le pesticide appartient ou le parasite sur lequel il agit, il s'ajoute à ces deux, la classification en fonction de leur usage.

1.2.1. Classification chimique

En se basant sur le **premier critère**, on peut distinguer trois catégories de pesticides :

a - Les pesticides inorganiques : Ils sont peu nombreux mais certains sont utilisés en très grande quantité comme le soufre ou le cuivre. Ce sont des pesticides très anciens dont l'emploi est apparu bien avant la chimie organique de synthèse. De cette époque ne subsistent aujourd'hui aucun insecticide, un seul herbicide employé en temps que désherbant total (chlorate de sodium) et quelques fongicides à base de soufre et cuivre comme la bouillie bordelaise ($[\text{Cu}(\text{OH})_2]_x, \text{CaSO}_4$) (Fillatre, 2011).

b - Les pesticides organo-métalliques : Ce sont des fongicides dont la molécule est constituée par un complexe fait d'un métal comme le zinc ou le manganèse et d'un anion organique dithiocarbamate (exemple : mancozèbe avec le zinc, manèbe avec le manganèse) (Fillatre, 2011).

c - Les pesticides organiques : Ils sont très nombreux et appartiennent à diverses familles chimiques (Tomlin, 2006). Il existe actuellement plus de 80 familles ou classes chimiques dont les plus connues sont : les organochlorés, les organophosphorés, les carbamates, les pyréthriinoïdes, les triazines, les benzimidazoles et d'autres groupes (tels que le dérivé dipiridiniques, organe mercuriale, organocincades, fenoxiacétiques, pyréthrines et les dérivés triaziniques) (Bazzi, 2010).

1.2.2. Classification biologique

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

1.2.3. Classification selon l'usage

Les substances actives peuvent être aussi classées en fonction de leur usage :

- Les pesticides sont utilisés dans plusieurs domaines d'activités pour lutter contre des organismes vivants nuisibles. Il existe six catégories de pesticides selon leur destination de traitement, à savoir : les cultures, les bâtiments d'élevage, les locaux de stockage des produits végétaux, les zones non agricoles, les bâtiments d'habitation, l'homme et les animaux.
- L'agriculture est de loin l'activité la plus consommatrice de pesticides. L'usage non agricole ne représente en effet que 12% du marché global (Fillatre, 2011).

1.3. Possibles modes d'expositions de l'homme aux pesticides

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

L'exposition aux pesticides se caractérise donc par une multiplicité des voies d'exposition, ces substances pouvant pénétrer dans l'organisme par contact cutané, par ingestion et par inhalation. La grande variété de produits rend difficile l'évaluation des expositions des populations, qu'il s'agisse de la population exposée professionnellement (agriculteurs ou manipulateurs), ou de la population générale. La figure 1 résume les possibles modes d'exposition de l'environnement et de l'homme aux pesticides.

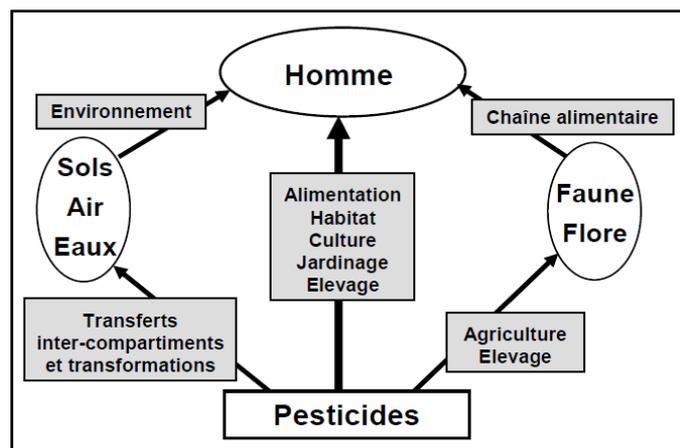


Fig. 1 : Modes d'exposition de l'homme aux pesticides (CPP, 2002).

1.3.1. Exposition professionnelle

L'exposition professionnelle concerne essentiellement les personnes manipulant les produits, au moment de la préparation, de l'application et du nettoyage des appareils de traitement. Les agriculteurs constituent une population particulièrement exposée qui forme un groupe sentinelle pour l'observation d'éventuels effets des pesticides. L'exposition professionnelle aux pesticides des agriculteurs est très variable et complexe selon les exploitations agricoles (CPP, 2002).

1.3.2. Exposition non professionnelle

L'ensemble de la population peut être exposé aux pesticides lors des usages domestiques ou d'entretien des jardins mais surtout à des résidus de ces pesticides au travers de son environnement (eau, air, particules en suspension, poussières) et de son alimentation. Les chiffres de l'OMS indiquent que la contamination des aliments par les pesticides est la voie d'exposition de loin la plus importante. Les évaluations de risque attribuent 90% de l'exposition à l'alimentation contre 10% à l'eau.

2. LES INSECTICIDES CARBAMATES (I.C.)

Les grandes familles chimiques de composés présentant une activité insecticide, parfois également acaricide, anti-arachnide et nématicide, sont les organochlorés, les organophosphorés, les carbamates et les pyréthrinoïdes. Les produits sont actifs sur l'insecte soit par ingestion et absorption digestive, soit par contact et absorption au niveau de la cuticule, soit par inhalation. Les cibles des insecticides sont ; selon les composés, le système

nerveux, la biosynthèse de la chitine, la production d'énergie ou encore l'hydratation des insectes.

Les insecticides agissant sur le système nerveux sont soit des poisons de l'axone : les organochlorés comme le DDT et les pyréthriinoïdes bloquent la fermeture des canaux sodium voltage-dépendants, l'endosulfan, les phénylpyrazolés et les avermectines bloquent le canal chlore couplé au récepteur GABA ou des poisons synaptiques, comme **les inhibiteurs de l'acétylcholinestérase** (organophosphorés et **carbamates**), les chloronicotinyles qui sont des agonistes irréversibles des récepteurs cholinergiques et les formamidines qui inhibent la monoamine-oxydase.

2.1. Nature chimique des insecticides carbamates

Les carbamates, dérivés de l'acide carbamique (HOC(O)NH_2) (figure 2) sont des insecticides puissants. Ces produits ont un large spectre d'action ; certains sont systémiques.

Ils agissent par contact et par ingestion, parfois également par inhalation, sur une grande variété d'insectes et de vers (Ecobichon, 2001 ; Agrawal et Sharma, 2010).

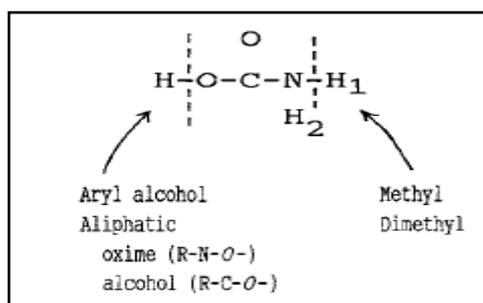


Fig. 2 : Structure de base de l'acide carbamique (Ecobichon, 2001).

La substitution de H soit par un groupement alcool aryle, aliphatique, oxime ou alcool et de H₁ soit par un groupement méthyle ou diméthyle donne les différents produits de la famille des insecticides carbamates.

2.2. Mécanisme d'action des insecticides carbamates

Les carbamates (tout comme les organophosphorés) ont un effet neurotoxique, aussi bien chez les insectes que chez les êtres homéothermes. Ils inhibent l'enzyme vitale ; l'acétylcholinestérase (AChE) dans le système nerveux (Reichel, 2010).

Dans les conditions normales, l'acétylcholinestérase hydrolyse rapidement et efficacement l'acétylcholine (ACh) dans la fente synaptique des neurones cholinergiques. Ces neurones synthétisent l'acétylcholine à partir de la choline et du cofacteur acétyle coenzyme A par l'enzyme synthétique ; l'acétylcholine transférase. Avant l'inactivation par l'acétylcholinestérase, les molécules d'acétylcholine interagissent avec les récepteurs

cholinergiques post-synaptiques pour propager l'impulsion de nerf, et/ou pour altérer la fonction cellulaire (excitation) (Pope et al., 2005).

L'inhibition de l'activité de l'acétylcholinestérase par les carbamates résulte par des niveaux accrus d'acétylcholine. En conséquence perturbant la fonction synaptique normale du nerf (Pope et al., 2005).

Le mécanisme d'action des insecticides carbamates (figure 3) est décrit selon les étapes suivantes (Ecobichon, 2001) :

- **Processus de carbamylation** : Le site actif de l'acétylcholinestérase qui contient un résidu sérine (AChEOH), réagit avec le carbamate (RX). Le groupe hydroxyle de sérine cède son hydrogène au groupement (R) formant le composé (RH) ;
- **Formation du complexe carbamate-AChE (AChEOX)** ; de ce fait, le site sérique de l'AChE est occupé inhibant donc l'hydrolyse de l'ACh ;
- **Réactivation de l'enzyme** : L'enzyme carbamylée (AChEOX) inhibée et instable peut être réactivée par l'hydrolyse du résidu carbamylée (XOH) en présence de l'eau pour libérer l'enzyme active et libre (AChEOH).

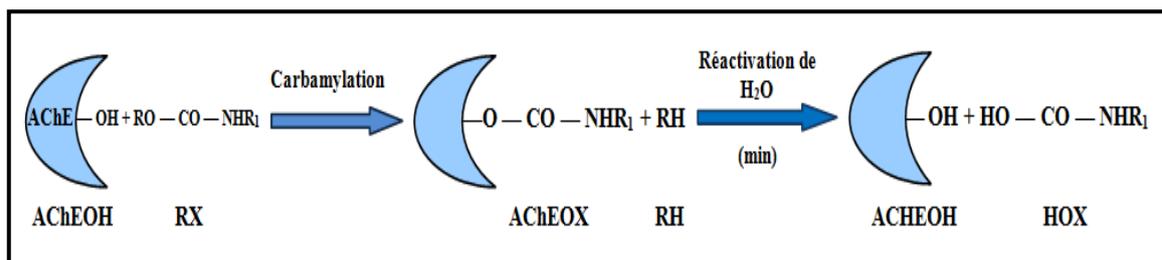


Fig. 3 : Mécanisme d'action des insecticides carbamates (Reichel, 2010).

Les carbamates établissent des liaisons covalentes avec le centre actif de l'AChE. La vitesse de rétablissement de la structure enzymatique est lente mais complète (inhibition réversible) (Reichel, 2010).

2.3. Cinétique des insecticides carbamates

Les carbamates sont absorbés par voie orale (> 90%), par inhalation (en aspirant des aérosols ou des poussières) et par voie cutanée. Ils sont rapidement métabolisés et éliminés de façon complète (Reichel, 2010).

2.4. Toxicité des insecticides carbamates

Les carbamates exercent leur toxicité par l'inhibition de l'acétylcholinestérase du tissu nerveux. Cependant, c'est une inhibition transite et réversible, puisqu'il y a une réactivation relativement rapide de l'enzyme en présence de l'eau tissulaire. Les effets biologiques d'accumulation de l'ACh tendent à être de courte durée, en termes d'heures (Ecobichon, 2001).

Les symptômes sont en principe les mêmes que pour les agents anti-cholinestérasés, cependant, ils disparaissent beaucoup plus vite et les cas de décès sont beaucoup plus rares (Reichel, 2010).

La toxicité aiguë des carbamates varie selon les mammifères, de l'aldicarbe, très toxique (DL50 orale : 1 mg/kg), au carbaryl (DL50 : 850 mg/kg) et au fénoxycarbe (DL50 : 17 g/kg) peu, voire très peu toxiques (Agrawal et Sharma, 2010).

2.5. Traitement de la toxicité des insecticides carbamates

De fortes doses d'atropine, donnée par voie veineuse, peuvent soulager la plupart des symptômes. Le pralidoxime, par voie veineuse, peut accélérer le rétablissement de la fonction nerveuse, éliminant la cause des symptômes et en plus des soins symptomatiques (Assurer l'oxygénation et élimination du toxique).

Les oximes sont contre-indiqués (amplification des effets dus aux carbamates et nocivités dues à leur toxicité propre) (Agrawal et Sharma, 2010 ; Reichel, 2010).

3. UN INSECTICIDE CARBAMATE : LE METHOMYL (MET)

3.1. Nature chimique du méthomyl

Le méthomyl (MET) (figure 4) est un insecticide de la famille chimique des carbamates, qui a été introduit par Du Pont en 1966 et lancé sur le marché avec des noms de marque comme *Lannate*, Nudrin, Metomex et Terbate...

Les produits contenant le méthomyl ont un large spectre d'application. Il est l'un des pesticides le plus fréquemment utilisés dans l'agriculture (Sinhaseni et al., 1995 ; IPCS, 1996 ; Mansour et al., 2009 ; Van Scoy et al., 2013).

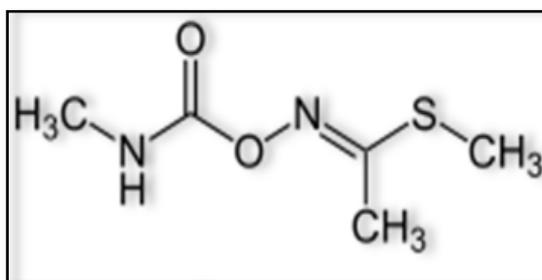


Fig.4 : Structure chimique du méthomyl (Van Scoy et al., 2013).

Le méthomyl est préparé en faisant réagir le *N*-hydroxythioacétimide de *S*-méthyle (MHTA) en solution dans le chlorure de méthylène, sur l'isocyanate de méthyle gazeux à 30-50°C (IPCS, 1996).

Il est principalement présenté sous forme de poudre hydrosoluble ou encore de liquide miscible à l'eau et à diluer pour le traitement des cultures au sol ou en pulvérisations aériennes (Kidd et James, 1991 ; IPCS, 1996).

3.2. Identité et propriétés physicochimiques du méthomyl

3.2.1. Identité

- Nom commun : Méthomyl ;
- Classe chimique : Carbamates ;
- Fonction : Insecticide ;
- Nom chimique selon IUPAC : *S*-méthyle *N*-[(méthylcarbamoyl) oxy] thioacétimide ;
- Nom chimique selon CAS : Méthyle *N*-[[méthyl-amino) carbonyl] oxy] éthanimidothioate ;
- No CAS : 16752-77-5 ;
- Formule Moléculaire : C₅H₁₀N₂O₂S (IPCS, 1996 ; Clive, 2001).

3.2.2. Propriétés physicochimiques

Le méthomyl pur se présente sous forme de solide cristallin blanc de masse molaire 162.23g/mol, avec une odeur légèrement sulfureuse et un point de fusion de 78 à 79°C. Il est soluble dans l'eau (58g/l) à 25°C ainsi que dans de nombreux solvants organiques (tableau 1) (IPCS, 1996 ; Van Scoy et *al.*, 2013).

Les solutions aqueuses en milieux fermés se décomposent lentement. La ventilation, la lumière solaire, l'alcalinité et les températures élevées provoquent sa décomposition dans l'eau.

Tab.1 : Propriétés physicochimiques du méthomyl
(IPCS, 1996 ; Tomlin, 2000 ; Van Scoy et *al.*, 2013).

<i>Propriétés</i>	<i>Résultats</i>
Masse moléculaire relative	162.23g/mol
État physique	Solide cristallin
Couleur	Blanc
Odeur	légèrement sulfureuse
Densité	1.2946 (à 24°C)
Pression de vapeur	0.72 mPa ; 5 × 10 ⁻⁵ mm Hg (à 25°C)
Point de fusion	78 à 79°C
Constante de la loi d'Henry	2.1 × 10 ⁻¹¹ atm.m ³ /mole
Stabilité	Stable en forme solide et dans les solutions aqueuses à pH 7.0 ou moins. Se décompose rapidement dans les solutions alcalines et dans les sols moites.
Solubilité	Solvant (g/kg) à 25°C : Eau 58 Méthanol 1000 Acétone 730 Ethanol 420

3.3. Propriétés biologiques du méthomyl

3.3.1. Mode d'action

Similaire aux autres insecticides carbamates, le méthomyl est un inhibiteur de l'acétylcholinestérase (AChE), contenue dans les jonctions synaptiques entre les neurones (Clive, 2001 ; Pope *et al.*, 2005 ; Van Scoy *et al.*, 2013).

Il est efficace de deux manières (IPCS, 1996 ; Baron, 1991) :

- Comme « insecticide de contact », il tue les insectes cibles par contact direct ;
- Comme « insecticide systémique » en raison de ses possibilités de causer l'empoisonnement systémique, après qu'il soit absorbé et transporté dans l'insecte cible qui se nourrit de la plante traitée. Il est capable d'être absorbé par les plantes sans être phytotoxique ou nocif.

3.3.2. Utilisation

Il est utilisé partout dans le monde sur toutes sortes de cultures. Il sert notamment à protéger les fruits, les vignes, le houblon, les légumes, les céréales, le soja, le coton et les plantes ornementales. A l'intérieur des bâtiments, on l'utilise aussi pour détruire les mouches dans les animaleries et les laiteries (IPCS, 1996).

3.3.3. Efficacité

Il a un large spectre d'action sur plus de 100 espèces d'insectes nuisibles comme un ovicide, larvicide et adulticide, il a en outre une action nématocide et acaricide intéressante (IPCS, 1996 ; Clive, 2001 ; Tamimi *et al.*, 2008).

3.4. Sources d'exposition environnementale et humaine

Dans l'environnement naturel, la décomposition abiotique du méthomyl par hydrolyse ou photolyse est lente ou nulle (Van Scoy *et al.*, 2013).

Le méthomyl est faiblement adsorbé aux particules du sol, la décomposition aérobie est environ deux fois plus rapide que la décomposition anaérobie (Tamimi *et al.*, 2008 ; Van Scoy *et al.*, 2013).

C'est un polluant majeur causant des soucis environnementaux en raison de son hydrosolubilité élevée et sa répétue utilisation contre plusieurs nuisibles. Il peut facilement causer la contamination des différentes ressources d'eau. En outre, de diverses quantités de résidu de méthomyl ont été détectées dans les eaux de surface et souterraines à travers l'Europe et en Amérique non seulement pendant l'application de l'insecticide mais également après une longue période d'utilisation (Tamimi *et al.*, 2008).

C'est essentiellement au cours de la préparation et de l'épandage de ces produits ou par suite de l'ingestion de résidus subsistant sur des cultures vivrières qu'il peut y avoir exposition humaine (IPCS, 1996).

3.5. Cinétique et métabolisme du méthomyl chez les animaux de laboratoire

Après administration à des rats par voie orale, le méthomyl est rapidement absorbé, métabolisé et excrété, l'ensemble du processus étant achevé en quelques jours. Une semaine après avoir administré à des rats du méthomyl radio-marqué à raison de 5 mg/kg de poids corporel, il a été constaté que 54% de la dose était excrétés dans l'urine, 2 à 3% dans les matières fécales et 34% dans l'air expiré (en l'espace de cinq jours). Au bout de sept jours, il restait dans les tissus et la carcasse 8 à 9% de la radioactivité, le ^{14}C étant incorporé dans les constituants endogènes. C'est dans le sang que la fraction radioactive était la plus importante (2% de la dose) (IPCS, 1996).

Chez ces rats, les principaux métabolites présents dans l'air expiré étaient du dioxyde de carbone et l'acétonitrile (rapport 2:1). Dans les urines, le principal métabolite était constitué par un dérivé mercapturique du méthomyl, à hauteur de 17% de la dose. De plus, il n'a pas décelé la présence de méthomyl ni de son oxime (IPCS, 1996).

La métabolisation proposée du méthomyl s'effectue selon le schéma suivant (figure 5) : Déplacement du groupe *S*-méthyle par le glutathion, puis transformation enzymatique en dérivé de l'acide mercapturique. Il existe une autre voie métabolique, à savoir l'hydrolyse en le *N*-hydroxythioacétimide de *S*-méthyle (MHTA) qui est ensuite rapidement décomposé pour donner du dioxyde de carbone. Il pourrait y avoir aussi conversion du syn-méthomyl (qui est la forme insecticide) en isomère anti, lequel serait ensuite décomposé en acétonitrile par des réactions d'hydrolyse, de transposition et d'élimination (IPCS, 1996).

Une heure après application cutanée à des souris d'une solution acétonique de méthomyl marquée au ^{14}C , il a été constaté que le taux de pénétration était de l'ordre de 85%. A ce moment, 3% de la dose étaient présents dans le sang, 5% dans le foie et 13% avaient été excrétés. Au bout de huit heures, l'excrétion totale était de 54.5% (IPCS, 1996).

3.6.1. Effets sur les mammifères de laboratoire et l'homme

a - Toxicité aiguë

Le méthomyl présente une forte toxicité aiguë par voie orale et par inhalation ; lorsque le composé est inhalé sous forme d'aérosol et très faible par exposition dermale ou cutanée (tableau 2). Chez le rat, les signes d'intoxication aiguë sont ceux que l'on peut attendre d'un inhibiteur de l'acétylcholinestérase et consistent, entre autres, en une hypersalivation, une larmimation, des tremblements, un myosis, une diarrhée et prostration. Aux doses mortelles les rats sont morts dans des heures. Les survivants ont commencé à récupérer dans plusieurs heures et avaient entièrement récupéré dans des jours. Il ne provoque pas d'irritation ou d'hypersensibilisation cutanée et il est légèrement irritant pour la muqueuse oculaire (IPCS, 1996).

Tab.2 : Valeurs de la toxicité aiguë du méthomyl chez les mammifères.

<i>Route d'exposition</i>	<i>Espèces</i>	<i>Résultats</i>	<i>Références</i>
Orale	Rat	DL50 : 12-48 mg/kg DL50 : 20 mg/kg	Ecobichon, 2001 Shalaby et <i>al.</i> , 2010
Orale	Souris	DL50 : 10 mg/kg	Baron, 1991
Orale	Cobaye	DL50 : 15 mg/kg	Baron, 1991
Inhalation	Rat	4h CL50 : 0.26 mg/l	IPCS, 1996
Dermale	Lapin (peau intacte)	DL50 : > 2000 mg/kg	IPCS, 1996
Dermale	Rat (peau abrasée)	DL50 : 1000 mg/kg	IPCS, 1996

b - Toxicité chronique

L'exposition prolongée ou répétée au méthomyl peut causer des symptômes semblables aux effets aigus du pesticide. L'exposition répétée à des faibles doses du méthomyl peut causer une inhibition insoupçonnée de l'acétylcholinestérase, ayant pour résultat comme des symptômes ; la faiblesse, le manque d'appétit, et les maux de muscle.

L'inhibition de l'acétylcholinestérase peut persister pendant deux à six semaines. Cette condition est réversible si l'exposition est discontinuée (Tsai et *al.*, 2003).

c - Effets sur la reproduction

Différentes études réalisées ont montré que le méthomyl est toxique pour la reproduction. L'administration chronique et subchronique de méthomyl chez le rat mâle et la souris a provoqué une perturbation dans les hormones sexuelles dans le sérum, une dysfonction gonadique, des perturbations dans les paramètres biochimiques, les activités

enzymatiques et des dommages histopathologiques dans les organes sexuelles (Mahgoub et EL-Medany, 2000 ; 2001 ; Manawadi et Kaliwal, 2010a ; Shalaby *et al.*, 2010).

Dans une étude récente, Shanthalatha *et al.* (2012) ont montré l'effet toxique du méthomyl sur le développement des follicules ovariens et la fertilité chez la souris.

d - Effets génotoxiques

Le méthomyl a un effet cytogénétique potentiel montré par des augmentations des micronuclées et des aberrations chromosomiques *in vitro* dans les lymphocytes humains (IPCS, 1996).

Dans une étude très récente, Guanggang *et al.* (2013) ont montré que le méthomyl est un agent fortement génotoxique et mène aux dommages de l'ADN et l'apoptose cellulaires.

e - Effets organotoxiques

Le foie, la rate, les reins, les poumons, les testicules et d'autres organes ont été affectés dans diverses expériences en fonction de la dose, la voie d'administration et la durée de l'exposition au méthomyl (Lohitnavy et Sinhaseni, 1998 ; Radad *et al.*, 2009 ; Shalaby *et al.*, 2010 ; El-Demerdash *et al.*, 2012 ; El-Demerdash *et al.*, 2013).

f - Effets sur l'homme

Le méthomyl est un composé fortement toxique chez l'homme. La dose létale est de 12 à 15 mg/kg de poids corporels (Gosselin *et al.*, 1984). La lecture des rapports sur les intoxications accidentelles et les suicides par empoisonnement avec du méthomyl éclaire quelque peu sur la gravité des effets, les possibilités de récupération et les décès (Miyazaki *et al.*, 1989 ; Driskell *et al.*, 1991 ; IPCS, 1996 ; Tsatsakis *et al.*, 2001).

Les décès chez l'homme ont également résulté des interactions additives ou synergiques entre le méthomyl et d'autres produits chimiques. Par exemple chez un homme âgé de 35ans, les actions stimulatrices défavorables de l'interaction entre le méthomyl et la nicotine sur le système nerveux ont eu comme conséquence la mort (Moriya et Hashimoto, 2005).

3.6.2. Effets écologiques chez les organismes non visés

Le méthomyl est toxique pour les poissons, les oiseaux et toute autre faune.

a - Effets sur les organismes aquatiques

Le méthomyl est moyennement à fortement toxique pour les poissons, les valeurs de CL₅₀ à 96 heures se situant, pour diverses espèces, dans l'intervalle 0.5-2 mg/l. Lors d'une étude toxicologique portant sur de jeunes cyprinidés de l'espèce *Pimephales promelas*, la MATC (concentration maximale acceptable de substance toxique) a été trouvée comprise entre 57 et 177 µg/l (IPCS, 1996 ; WHO, 2005).

Des études de toxicité aiguë portant sur d'autres organismes aquatiques ont montré que *Daphnia magna* était l'espèce la plus sensible au méthomyl, la CL₅₀ à 48 h étant de 32 µg/l et la concentration maximale acceptable de substance toxique (MATC) pour le méthomyl était comprise entre 1.6 et 3.5 µg/l (IPCS, 1996 ; Pereira et Gonçalves, 2007).

b - Effets sur les abeilles

Le méthomyl est toxique pour les abeilles, la DL50 par contact étant de 1.29 µg/insecte et la DL50 par voie orale, de 0.2 µg/insecte (IPCS, 1996 ; WHO, 2005).

c - Effets sur les oiseaux

Par évaluation de la toxicité aiguë du méthomyl chez plusieurs espèces d'oiseaux, les valeurs caractéristiques de DL50 par voie orale se situant à 10 mg/kg de poids corporel chez les pigeons et à 34 mg/kg de poids corporel chez la caille japonaise. Il est relativement moins toxique lorsqu'il est mêlé à la nourriture (IPCS, 1996 ; Tomlin, 2000 ; Villar *et al.*, 2010).

3.7. Insecticides carbamates, méthomyl et stress oxydant

Plusieurs études montrent que les carbamates provoquent un état du stress oxydant par la surproduction des espèces réactives oxydantes (ERO) qui exercent des effets délétères sur les tissus du rat tels que le foie, le rein, le cerveau et les érythrocytes. Ces ERO jouent un rôle important dans la toxicité des pesticides et des produits chimiques environnementaux, en induisant des perturbations dans les systèmes antioxydants ; en diminuant les taux des antioxydants ou le changement dans le système enzymatique. Ces perturbations sont accompagnées par un état oxydant marqué par l'augmentation de la peroxydation lipidique, des dommages cellulaires et les paramètres caractéristiques des organes (Banerjee *et al.*, 1999 ; Kamboj *et al.*, 2006 ; Rai et Sharma, 2007 ; Kamboj *et al.*, 2008 ; Gupta *et al.*, 2009 ; Rai *et al.*, 2009 ; Agrawal et Sharma, 2010).

En outre à leur activité anticholinestérase, le méthomyl peut induire le stress oxydant. De nombreuses études chez plusieurs animaux d'expérience ont mis en évidence que la présence du méthomyl dans la cellule génère la production des ERO. Les activités des systèmes antioxydants de défenses et les taux de la peroxydation lipidique membranaire des différents tissus sont altérés, dus à l'intoxication par le méthomyl (El-Khawaga, 2005 ; Garg *et al.*, 2009 ; Mansour *et al.*, 2009 ; Manawadi et Kaliwal, 2010 ; El-Demerdash *et al.*, 2012 ; El-Khawaga, 2012 ; El-Demerdash *et al.*, 2013).



Chapitre 2 :
Stress oxydatif

STRESS OXYDATIF

1. DEFINITION DU STRESS OXYDATIF

Le stress oxydatif, dénommé également stress oxydant, résulte d'un déséquilibre de la balance « pro-oxydants/antioxydants » en faveur des oxydants, ce qui se traduit par des dommages oxydatifs de l'ensemble des constituants cellulaires : les lipides avec perturbations des membranes cellulaires, les protéines avec l'altération des récepteurs et des enzymes, les acides nucléiques avec un risque de mutation et de cancérisation. Un stress oxydatif peut donc se développer suite à une surproduction des oxydants comme les espèces activées de l'oxygène et/ou à une diminution des systèmes de défense antioxydants (Sergent et *al.*, 2000).

2. ESPECES REACTIVES OXYDANTES (ERO)

2.1. Définition

Un **radical libre** (RL) est une entité chimique (atome, molécule ou fragment de molécule) capable d'exister sous forme indépendante, contenant au moins un électron célibataire ou non apparié sur sa couche électronique externe (ou contenant deux électrons de même spin dans une case quantique), ce qui augmente considérablement sa réactivité par nécessité de se combiner avec un autre électron pour atteindre la stabilité selon un phénomène d'oxydation (Bonfont-Rousselot et *al.*, 2003 ; Finaud et *al.*, 2006). Sa durée de vie est très courte (quelques millisecondes voir quelque nanosecondes) et il est symbolisé par un point qui indique où l'électron libre se situe (Goto et *al.*, 2008).

Les radicaux libres peuvent être formés par trois procédés :

1. Addition d'un électron libre à un non radical ($\text{NR} + e^- \rightarrow \text{R}^\bullet$) ;
2. Perte d'un électron par un non radical ($\text{NR} - e^- \rightarrow \text{R}^\bullet$) ;
3. Scission homolytique d'une liaison covalente ($\text{A:B} \rightarrow \text{A}^\bullet + \text{B}^\bullet$) (Bonfont-Rousselot et *al.*, 2003).

Il existe majoritairement deux grandes familles d'espèces réactives :

- **Les espèces réactives oxygénées** (ERO ou ROS Reactive Oxygen Species) ; également désignées dans la littérature de dérivés réactifs de l'oxygène ou d'espèces réactives de l'oxygène peuvent être définies comme des molécules qui contiennent de l'oxygène mais qui sont plus réactives que l'oxygène présent dans l'air. Les ERO incluent les radicaux libres comme l'anion superoxyde ($\text{O}_2^{\bullet-}$) et le radical hydroxyle (OH^\bullet) et des composés réactifs

oxydants non radicalaires (sans électrons libres dans leur couche externe) comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), l'oxygène singulet (1O_2) et l'ozone (O_3).

- **Les espèces réactives azotées** (ERA ou RNS Reactive Nitrogen Species) ont été définies comme un sous groupe d'oxydants dérivés de l'oxyde nitrique ou monoxyde d'azote ($\cdot NO$). Ceci a poussé certains auteurs à parler de RONS (Reactive Oxygen and Nitrogen Species) au lieu de ROS pour désigner l'ensemble des espèces réactives oxydantes radicalaires ou non radicalaires (Mac Laren, 2007), que nous désignons par l'abréviation ERO (Tableau 3).

Tab.3 : Principales espèces réactives oxydantes (ERO) organiques.

<i>ERO</i>	<i>Abréviation</i>
<u>Espèces oxygénées actives</u>	
Radical (ion, anion) superoxyde	$O_2^{\cdot -}$
Radical hydroperoxyde	HO_2^{\cdot}
Peroxyde d'hydrogène	H_2O_2
Radical hydroxyle	$\cdot OH$
Singulet oxygène	1O_2
Ozone	O_3
<u>Espèces azotées actives</u>	
Oxyde Nitrique ou monoxyde d'azote	$\cdot NO$
Dioxyde d'azote	$\cdot NO_2$
Peroxynitrite	$ONOO^{\cdot}$

2.2. Formation des espèces réactives oxydantes (ERO)

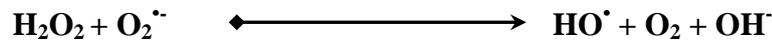
2.2.1. ERO radicalaires

a - L'anion superoxyde ($O_2^{\cdot -}$)

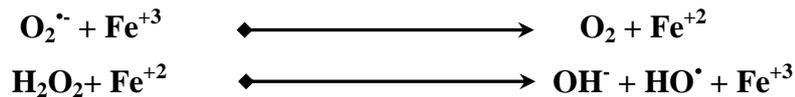
C'est l'une des premières ERO à être formées, l'espèce la plus couramment générée par la cellule ; l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot -}$) peut provenir de plusieurs sources cellulaires. Il est formé après réduction d'une molécule d' O_2 par un électron et en présence d'un cofacteur NADPH. Les différentes enzymes permettant cette réaction sont : la NADPH oxydase, la xanthine oxydase, les cyclo-oxygénases ou COX, les lipo-oxygénases, les oxyde nitrique synthases NOS (Nitric Oxyde Synthases), les enzymes du réticulum endoplasmique lisse (cytochrome P450) et celles de la chaîne de transport des électrons dans la mitochondrie (Cai et Harrison, 2000).

b - Le radical hydroxyle (HO[•])

Le radical hydroxyle (HO[•]) peut être induit par la réduction de l'H₂O₂ selon la réaction d'Haber-Weiss engendrant alors un ion OH⁻ inoffensif et un radical hydroxyle HO[•].



Cette réaction est lente et probablement inopérante dans les tissus vivants. Mais en revanche, en présence de métaux de transition (fer, cuivre), l'H₂O₂ donne naissance *in vivo* via la réaction de Fenton à un radical hydroxyle HO[•] hautement réactif.



Il est certainement l'ERO la plus destructrice pour la cellule et ses composants. Malgré une durée de vie très brève et l'impossibilité pour lui de franchir les membranes, il possède une très grande réactivité liée à un potentiel oxydant très élevé (Bonnefont-Rousselot et *al.*, 2003).

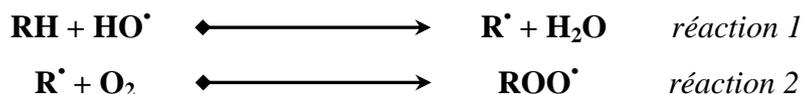
c - L'oxyde nitrique (NO[•])

L'oxyde nitrique est un gaz qui ainsi diffuse bien à travers les membranes. Il est synthétisé par l'enzyme oxyde nitrique synthase (NOS) à partir de l'O₂ et l'acide aminé L-arginine. Il n'est vraiment délétère pour la cellule que lorsqu'il est présent en quantité importante et qu'il génère ainsi une autre ERO : le peroxyde nitrite NO₃⁻ (Bonnefont-Rousselot et *al.*, 2003).

d - Les radicaux peroxy (ROO[•])

Ils font plutôt partie de la « deuxième vague » d'ERO, dans la mesure où leur formation fait suite à une réaction d'oxydation d'acides gras polyinsaturés par d'autres ERO formées préalablement.

La partie « R » correspond à un acide gras polyinsaturé. Leur formation comprend 2 étapes principales : la première (réaction 1) correspond à la perte d'un atome d'hydrogène causée notamment par un radical hydroxyle, et la seconde (réaction 2) à la liaison avec une molécule d'oxygène (McMichael, 2007 ; Powers et Jackson, 2008) :



2.2.2. ERO non radicalaires

a - L'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$)

L'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$) correspond à une forme excitée de l'oxygène O_2 , il possède la même structure électronique que l'oxygène mais « agencée » différemment, à savoir que les électrons de la couche externe initialement non appariés se sont appariés. Il n'est donc pas radicalaire. Son état « excité » lui confère un potentiel oxydant supérieur à celui de l'oxygène (Bonnefont-Rousselot et *al.*, 2003).

b - Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)

Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) est une molécule stable, mais diffusable et avec une durée de vie compatible avec une action à distance de son lieu de production. Il est généré dans le peroxysome, les microsomes et les mitochondries par une réaction de dismutation (Ramirez et *al.*, 2008).



La dismutation de $\text{O}_2^{\cdot-}$ spontanée ou catalysée par les superoxydes dismutases est la source majeur de l' H_2O_2 . L' H_2O_2 n'est pas un radical libre mais a la capacité de générer des radicaux hautement réactifs. En présence de métaux de transition (fer et cuivre), l' H_2O_2 donne naissance via la réaction de Fenton à un radical hydroxyle HO^{\cdot} hautement réactif (Bonnefont-Rousselot et *al.*, 2003).

c - Le peroxyde nitrite ($\text{NO}_3^{\cdot-}$)

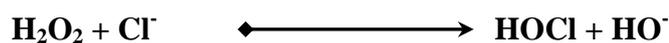
Son apparition est extrêmement rapide, et se produit par une réaction entre deux ERO :



A l'instar du radical hydroxyle, $\text{NO}_3^{\cdot-}$ est une ERO qui cause beaucoup de dommages aux composants cellulaires (Bonnefont-Rousselot et *al.*, 2003).

d - L'acide hypochlorique (HOCl)

Il est formé à partir du peroxyde d'hydrogène. Il passe facilement à travers les membranes biologiques, et peut altérer les constituants protéiques de la cellule à cause de son fort pouvoir oxydant (Bonnefont-Rousselot et *al.*, 2003) :



Un récapitulatif des principales ERO et de leurs formations est présenté dans la figure 6 qui suite.

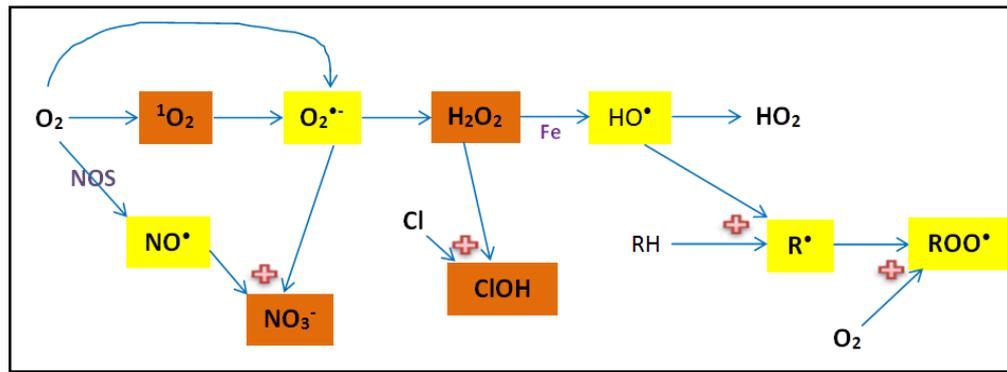


Fig.6 : Cascade de production des principales ERO : en orange ERO non radicalaires et en jaune ERO radicalaires (Favier, 1997).

2.3. Rôle physiologique des espèces réactives oxydantes

De façon physiologique, les ERO existent dans les cellules et dans les tissus à des concentrations faibles mais mesurables (Halliwell et Gutteridge, 1989 ; Sies, 1991). Elles protègent, régulent la cellule et permettent de maintenir une certaine homéostasie de l'état redox de l'organisme. Lorsqu'elles sont produites dans un compartiment cellulaire spécifique, elles peuvent participer au fonctionnement de certaines enzymes, intervenir dans la défense immunitaire (Oxidative Burst ou Flambée Respiratoire), agir en tant que second messager cellulaire, intervenir dans les voies de transduction du signal et réguler les fonctions cellulaires (Dikalov et *al.*, 2007).

3. MECANISME D'ACTION DES ESPECES REACTIVES OXYDANTES

Les ERO réagissent avec les premières molécules qu'elles rencontrent. Elles ont comme cible les lipides, les protéines, les glucides et les acides nucléiques (Beckman et Ames, 1998).

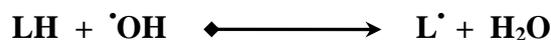
3.1. Les cibles lipidiques

Les acides gras polyinsaturés (AGPI) sont les cibles privilégiées des ERO radicalaires en raison de leurs hydrogènes bis-allyliques facilement oxydables. Plus l'acide gras est insaturé et plus il est susceptible d'être peroxydé, c'est-à-dire dégradé par un processus oxydant non enzymatique. Le mécanisme radicalaire comporte trois étapes successives : **l'initiation, la propagation et la terminaison** (Halliwell et Gutteridge, 1989).

La phase d'initiation débute par une cassure homolytique d'une liaison sous l'arrachement d'un hydrogène (création d'un radical d'acide gras (R[•]) à partir d'un acide gras

(RH)). Cette déshydrogénation peut être provoquée par un initiateur radicalaire tel que le $\cdot\text{OH}$ et le $\text{HOO}\cdot$.

Phase d'initiation : (formation d'un radical lipidique)



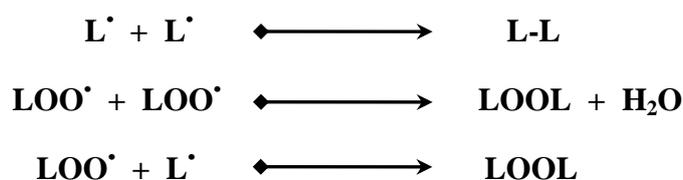
Le radical lipidique $\text{R}\cdot$ subit ensuite un réarrangement moléculaire pour donner un radical avec une structure de diène conjugué, plus stable. La propagation est réalisée par la fixation d'une molécule d' O_2 et formation un radical peroxy ($\text{ROO}\cdot$) (Esterbauer et *al.*, 1992). Ce radical est suffisamment réactif pour arracher à nouveau, un hydrogène à un acide gras polyinsaturé voisin, propageant ainsi la réaction. L'hydroperoxyde lipidique (ROOH) formé peut être oxydé en présence de métaux de transition divalents Fe^{2+} ou Cu^{2+} et entraîner la formation d'alcalanes et d'aldéhydes toxiques.

Phase de propagation :



La réaction en chaîne peut être interrompue (phase de terminaison) par l'association de deux radicaux libres et la formation d'un composé stable ou le plus souvent par la réaction du radical avec une molécule antioxydante (Delattre et *al.*, 2005).

Phase de terminaison : (Formation de composés stables)



L'attaque des lipides concerne les lipoprotéines circulantes ou les phospholipides membranaires. Dans le premier cas, l'oxydation des lipides ou des lipoprotéines circulants aboutit à la formation des LDL oxydés qui peuvent être captés par les macrophages et former des dépôts lipidiques de la plaque d'athérome. Dans le second cas, l'attaque des phospholipides membranaires modifie la fluidité de la membrane et perturbe le fonctionnement des récepteurs et des transporteurs se trouvant à leur surface (Favier, 2003).

La peroxydation lipidique fournit ainsi une grande variété de produits, dont certains peuvent réagir avec les protéines et l'ADN. Parmi les produits formés lors de la peroxydation lipidique, l'isoprostane, le malonyldialdéhyde (MDA) et le 4-hydroxynonéal (4-HNE) ont été étudiés comme marqueur de la peroxydation lipidique (Bonfont-Rousselot et *al.*, 2003).

3.2. Les cibles non lipidiques

a - Oxydation des protéines

A cause de leur abondance dans l'organisme, les protéines sont une cible importante des ERO.

Les modifications oxydatives des protéines provoquent l'introduction d'un groupement carbonyle dans la protéine (formation de protéines carbonylées « PC ») (Levine, 2002). Ces réactions d'oxydation sont fréquemment influencées par les métaux de transition (Bloomer et *al.*, 2004). Elles peuvent être classées en deux catégories : d'une part, celles qui cassent les liaisons peptidiques et modifient la chaîne peptidique, et d'autre part, les modifications des peptides par addition de produits issus de la peroxydation lipidique comme le 4-HNE (Levine, 2002). Il s'ensuit plusieurs types de modifications : fragmentation de la protéine, oxydation des chaînes latérales des acides aminés et formation de liaisons croisées entre deux protéines (Bonfont-Rousselot et *al.*, 2001). Ces modifications conduisent généralement à une perte de fonction catalytique ou structurale des protéines affectées (Levine, 2002) et deviennent généralement plus sensibles à l'action des protéases et sont donc éliminées. L'oxydation de la cystéine est réversible mais peut également perturber les fonctions biologiques du glutathion (GSH) ou de certaines protéines. Le rôle des protéines dans la cellule est tel que leur dysfonctionnement peut bouleverser le fonctionnement cellulaire (enzymes et protéines structurales) (Delattre et *al.*, 2005).

L'accumulation des protéines oxydées est souvent mesurée par leurs contenus en carbonyles ou en nitrotyrosines (tyrosine oxydé). La détermination des protéines carbonylées (PC) se fait par spectrophotométrie et la détermination des nitrotyrosines peut se faire par HPLC.

b - Oxydation des glucides

Les cibles glucidiques sont essentiellement le glucose et les protéoglycanes du cartilage. L'oxydation au sens large du glucose est aussi appelée « glycosoxydation » et regroupe en fait 2 mécanismes possibles (figure 7) (Halliwell et Gutteridge, 2007) :

- Soit oxydation au sens strict du glucose, donnant des dérivés carbonyles susceptibles de réagir avec une protéine, pour aboutir à la formation de « produits finaux de glycosylation » ou PFG (AGEs en anglais pour « *advanced glycation end-products* ») ;
- Soit formation d'une liaison covalente entre un ose et les groupements aminés libres d'une protéine : on parle de « glycosylation non-enzymatique des protéines ». Cela forme une protéine glyquée, qui peut être attaquée par des ERO telles que HO[•] ou NO₃⁻ pour former des PFG.

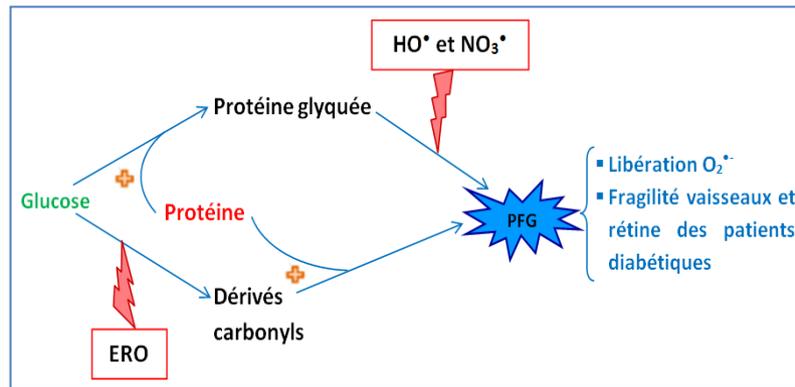


Fig.7 : Oxydation au sens large du glucose ou « Glycosoxydation », selon les 2 voies principales : glycosylation non enzymatique des protéines en haut, et oxydation au sens strict du glucose en bas. PFG : produits finaux de glycosylation (Halliwell et Gutteridge, 2007).

Ces PFG sont d'une importance capitale, car en présence de métaux de transition ils favorisent la libération d'O₂^{•-}, et fragilisent les parois vasculaires et la rétine chez les patients diabétiques (Grandjean, 2005).

c - Altérations des acides nucléiques

Les ADN nucléaires et mitochondriaux constituent une cible cellulaire importante. Les bases qui composent l'ADN sont sensibles à l'oxydation. Ces attaques sont essentiellement causées par le HO• (Cadet et al., 2002).

Elles sont de différents types (Grandjean, 2005) :

- Modification de base azotée, en particulier la guanine qui peut être transformée en 8-hydroxy-2'-déoxyguanosine (8-OHdG) ou encore la thymine en thymine glycol. Cela entraîne un non-appariement des bases, ou un mauvais appariement, ou encore un blocage de la réplication de l'ADN ;
- Destruction de la liaison entre la base et le désoxyribose, à l'origine d'un site dépourvu de base ou « abasique », qui s'avère être non fonctionnel ;
- Destruction du désoxyribose, responsable d'une cassure de brin, létale pour la cellule ;
- Formation de pontages avec des protéines, ou avec des dérivés d'oxydation lipidique (des aldéhydes mutagènes tel que le MDA, formant des adduits sur les bases de l'ADN de type MDA-guanine).

Ainsi nous constatons que ces dommages peuvent participer à une mutagénèse, à un arrêt des divisions cellulaires par blocage des mécanismes de réplication, à un arrêt de la synthèse protéique par blocage des mécanismes de transcription/traduction, et enfin à une mort cellulaire.

Selon McMichael (2007), les ERO pourraient même être impliquées dans l'initiation et la progression d'un cancer.

La 8-OHdG peut être dosée dans le sang et dans l'urine, mesurée par différentes techniques de HPLC et servie également de marqueur de l'oxydation de l'ARN et du stress oxydant.

4. LES ANTIOXYDANTS

L'organisme est doté d'un ensemble de systèmes de défenses très efficaces contre la surproduction d'ERO. Le terme d'antioxydant désigne toute substance qui, présente à faible concentration par rapport à celle du substrat oxydable, retarde ou inhibe significativement l'oxydation de ce substrat (Halliwell, 1990). Les systèmes antioxydants peuvent être classés selon leur mode d'action, leur localisation cellulaire et leur origine (Delattre et *al.*, 2005).

On distingue classiquement 2 catégories d'antioxydants : les antioxydants enzymatiques ; comprenant des enzymes aux propriétés catalytiques spécifiques et les antioxydants non enzymatiques pour lesquels nous différencierons ceux qui sont liposolubles et donc répartis dans les membranes biologiques de ceux qui sont hydrosolubles et donc plutôt répartis dans le cytosol, le milieu extracellulaire et le plasma.

Les stratégies de défense vis-à-vis du stress oxydant sont variées (figure 8).

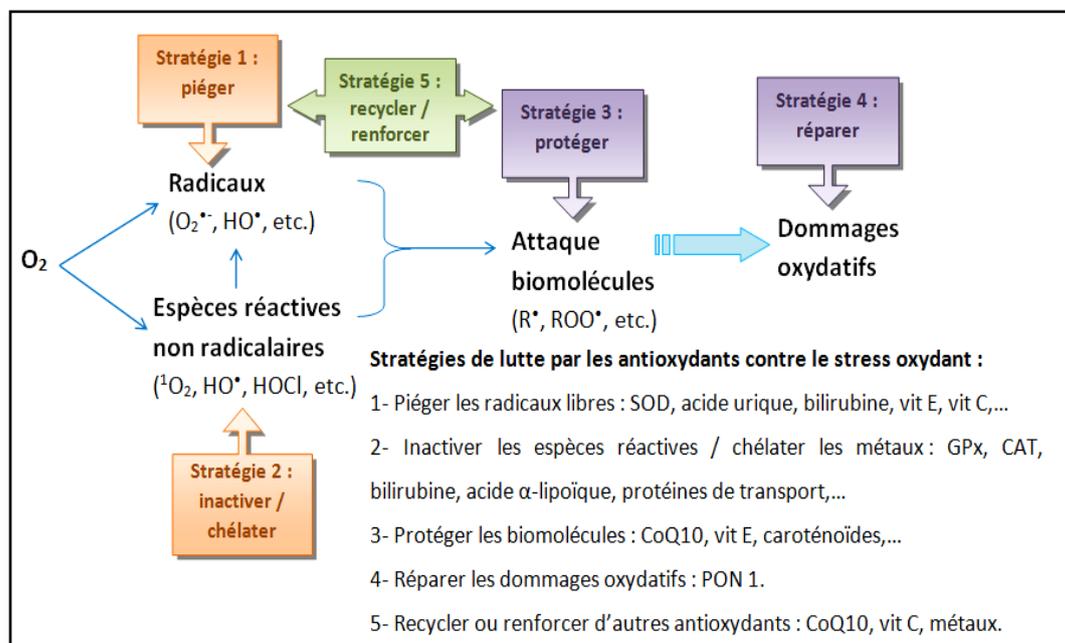


Fig.8 : Stratégies de lutte des antioxydants contre les causes et les conséquences du stress oxydant (Grandjean, 2005).

4.1. Antioxydants enzymatiques

Plusieurs enzymes sont impliquées dans la défense antioxydante. Les trois enzymes antioxydantes majeures sont les superoxydes dismutases (SOD), les glutathions peroxydases (GPx) et la catalase (CAT).

4.1.1. Les superoxydes dismutases (SOD)

Les superoxydes dismutases (SOD) (EC 1.15.1.1) sont des métalloenzymes ubiquitaires qui catalysent la dismutation des ions superoxydes en peroxydes d'hydrogène et oxygènes moléculaires (Comhair et Erzurum, 2002) selon la réaction suivante :



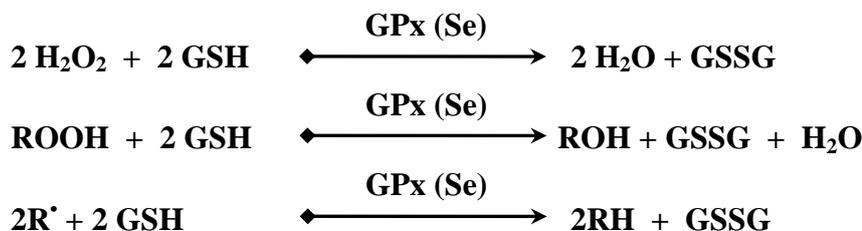
Ces enzymes accélèrent la vitesse de cette réaction spontanée rendant très rapide la disparition du superoxyde mais en générant le peroxyde d'hydrogène.

Chez les mammifères, on distingue dans cette famille trois isoenzymes qui catalysent la même réaction mais diffèrent selon la localisation chromosomique du gène, leur contenu métallique, leur structure quaternaire et leur localisation cellulaire (Zelko et al., 2002). Le mécanisme réactionnel est catalysé par un métal situé au centre de l'enzyme dont la nature permettra de distinguer la SOD à cuivre et zinc présent dans le cytoplasme (cCu, Zn-SOD ou SOD1), la SOD à manganèse (Mn-SOD ou SOD2) présent dans les mitochondries, et une SOD extracellulaire c'est une SOD à cuivre-zinc (Ec-SOD ou SOD3) (Crapo, 1997).

4.1.2. Les glutathions peroxydases (GPx)

Les glutathions peroxydases (EC 1.11.1.9) présentes dans la plupart des tissus de mammifères, sont des enzymes formées de quatre sous unités contenant chacune un atome de sélénium incorporé dans une molécule de sélélocystéine. Elles catalysent la réduction par le glutathion réduit (GSH) du peroxyde d'hydrogène en eau et de divers hydroperoxydes lipidiques produits (ROOH) en alcools et des espèces radicalaires en espèces non radicalaires.

Les réactions mises en jeu sont les suivantes (Reichel, 2010) :



L'action des GPx dépend de la biodisponibilité en GSH, glutathion réductase (GR) et NADPH. La GR catalyse la réduction du glutathion oxydé GSSG (obtenue dans chacune des

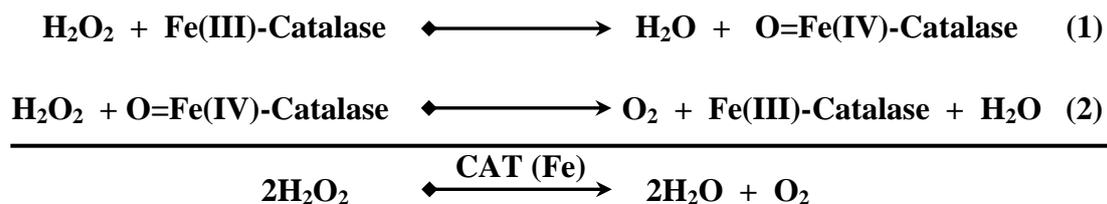
réactions précédentes) en glutathion réduit GSH à l'aide du cofacteur NADPH, provient de l'oxydation du glucose-6-phosphate en 6-phosphogluconate par la glutathion-6-phosphate déshydrogénase, de la voie des pentoses phosphates (Bonnefont-Rousselot et *al.*, 2003) :



On distingue 5 isoenzymes de la GPx contenant du sélénium chez les eucaryotes : la GPx1 ou c-GPx cytoplasmique et mitochondriale, la GPx2 ou gi-GPx gastrointestinale, la GPx3 ou p-GPx plasmatique, la GPx4 membranaire ou hydroperoxyde phospholipide glutathion peroxidase (HP-GPx) et la GPx5 ou sn-GPx épидидymaire (Comhair et Erzurum, 2002). La plus abondante est la GPx1 qui est exprimée dans la plupart des cellules.

4.1.3. La catalase (CAT)

La catalase (**EC 1.11.1.6**) est une protéine héminique, formée de quatre chaînes polypeptidiques, comportant chacune un groupe hème, qui constituent les sites actifs de la CAT (Delattre et *al.*, 2005). Elle catalyse la transformation du peroxyde d'hydrogène en eau et oxygène moléculaire pour prévenir la formation de radicaux hydroxyles (Bonnefont-Rousselot et *al.*, 2003). Pour catalyser la réaction, l'atome de fer du groupement hème réalise une coupure hétérolytique de la liaison O-O du peroxyde d'hydrogène, ce qui crée une molécule d'eau et un coupement Fe(IV)=O très oxydant ; ce dernier peut ensuite oxyder une autre molécule de H₂O₂ pour donner du dioxygène. Cette réaction est illustrée par les deux demi-équations suivantes (Bonnefont-Rousselot et *al.*, 2003) :



La catalase est essentiellement présente dans les érythrocytes et dans les peroxysomes de nombreux tissus et cellules (Reichel, 2010).

4.2. Antioxydants non enzymatiques

4.2.1. Antioxydants non enzymatiques liposolubles

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

a) La vitamine E

La vitamine E est un terme générique pour tous les tocophérols et les tocotriénols, desquels existent 8 dérivatifs et dont l'alpha-tocophérol (α -ToCH) est la forme la plus active de la classe des tocophérols. Cette vitamine est décrite comme étant le principal antioxydant liposoluble dans le plasma et les érythrocytes chez l'homme. Situé dans les lipoprotéines et dans les membranes, l' α -tocophérol est capable de piéger les radicaux $O_2^{\cdot-}$ et HO^{\cdot} , et de stabiliser le 1O_2 . Mais son principal rôle biologique est de réagir avec les radicaux ROO^{\cdot} pour former un radical tocophéryle, elle joue donc un rôle protecteur en empêchant la propagation de la peroxydation lipidique induite par un stress oxydant. Par la suite la vitamine E oxydée pourra être reconvertie principalement par la vitamine C, mais également par d'autres composés comme le GSH, la vitamine A et l'ubiquinol (Delattre et *al.*, 2005).

b) Les caroténoïdes (Vitamine A)

La vitamine A est un nom générique pour les rétinoïdes (rétinol, rétinol et acide rétinoïque) et les provitamines A ou les caroténoïdes (bêta-carotène, lutéines, lycopènes,...). Le β -carotène est le principal précurseur de la vitamine A. Les autres caroténoïdes peuvent être de puissants antioxydants, mais ils sont moins connus et abondants. Les caroténoïdes piègent les molécules d'oxygène singulet formées par les radiations solaires. Grâce à leur longue chaîne carbonée, riche en doubles liaisons, ils sont également de bons piègeurs de radicaux peroxydes. Une molécule de caroténoïde peut piéger plusieurs espèces radicalaires avant d'être détruite (Goudable et Favier, 1997).

c) L'ubiquinol (Coenzyme Q10)

Le coenzyme Q10 est un transporteur d'électrons présent dans la chaîne oxydative mitochondriale, dans les membranes cellulaires, dans le plasma et dans les lipoprotéines. Il est capable de donner des électrons et permet à ce titre une protection des membranes contre la lipoperoxydation (Powers et Jackson, 2008). Il assure également un recyclage de la vitamine E, par réduction de la forme oxydée (Ernster et Forsmark-Andree, 1993).

4.2.2. Antioxydants non enzymatiques hydrosolubles

Ces antioxydants sont répartis dans le cytosol, le plasma et le milieu extracellulaire. On retrouve : la vitamine C, le glutathion, l'acide urique, la bilirubine et l'acide alpha-lipoïque.

a) La vitamine C

La vitamine C ou acide L-ascorbique est hydrosoluble. Elle joue un rôle de prévention de l'oxydation dans le plasma et les fluides extracellulaires, dont elle est considérée comme le plus important antioxydant (Koolman et Röhm, 2004). Son action est directe et indirecte, elle

agit directement sur les ERO (superoxydes, hydroxyle, oxygène singulet, radicaux lipidiques) et indirectement par son action de régénération de la vitamine E et du GSH. L'organisation spatiale de la vitamine C lui permet de se lier à la phase aqueuse de la vitamine E oxydée dans la membrane cellulaire, et de rapidement lui céder son électron. Après avoir cédé son électron, la vitamine C forme un radical très peu réactif, qui sera ensuite reconverti en vitamine C par une enzyme réductase, qui utilise du GSH ou par l'acide alpha-lipoïque (Duarte *et al.*, 2007).

b) Le glutathion (GSH)

Le glutathion, sous sa forme réduite, est un tripeptide formé par la condensation d'acide glutamique, de cystéine et de glycine : γ -L-glutamyl-cystéinyl-glycine. C'est le thiol intracellulaire ubiquiste le plus abondant. Sous l'action de la GPx, il désintoxique les ERO (H_2O_2 , peroxy-nitrites, peroxydes lipidiques,...) en formant du GSSG (glutathion oxydé) composé de deux molécules de GSH (Douris *et al.*, 2009). Il est détoxifiant au niveau hépatique et peut se lier aux métaux toxiques (mercure, arsenic, plomb,...) (Meister, 1994 ; Clarkson et Thompson, 2000 ; Lyn Patrick, 2006). Le GSH intervient également dans le cycle de régénération de 2 vitamines antioxydantes : la vitamine E et la vitamine C (Powers et Jackson, 2008).

La régénération du GSH à partir du GSSG se fait principalement grâce à l'intervention de la glutathion réductase, et elle consomme une molécule de NADPH. Le NADPH provient de la voie des pentoses phosphates pour la majorité des tissus (Lawler et Demaree, 2001).

Sous sa forme GSH, GSSG et de son ratio GSH/GSSG, le glutathion est utilisé comme marqueur du système antioxydant et du stress oxydant, analysé par spectrophotométrie (De Moffarts *et al.*, 2007).

c) L'acide urique

L'acide urique comme produit final du métabolisme des purines (Baillie *et al.*, 2007). Il a été proposé comme un des meilleurs antioxydants du plasma *in vivo*, où il pourrait contribuer à 35-60% de la capacité antioxydante totale (Waring *et al.*, 2003). Il agit comme un donneur d'électrons capable ainsi de stabiliser les radicaux hydroxyle et peroxyde et l'oxygène singulet (Powers et Jackson, 2008).

L'acide urique peut être oxydé en différents produits dont le prédominant est l'allantoïne (Hellsten *et al.*, 2001), puis est régénéré par la vitamine C.

d) La bilirubine

La bilirubine est le produit de dégradation des hèmes (ex : hémoglobine). Ses propriétés antioxydantes sont liées à sa capacité à lutter contre les radicaux ROO^\bullet et contre le

H₂O₂ (Powers et Jackson, 2008) et de piéger le ¹O₂, protégeant ainsi l'albumine et les acides gras liés à l'albumine des attaques radicalaires (Neuzil et Stocker, 1993).

Elle est alors transformée en biliverdine, oxydée, qui sera recyclée grâce à la biliverdine reductase aux dépends d'une molécule de NADPH (Liu, 2006).

e) L'acide alpha-lipoïque

L'acide α -lipoïque est un cofacteur d'un complexe enzymatique qui participe au cycle de Krebs : le complexe α -cétoglutarate déshydrogénase. Il agit de différentes manières comme antioxydant : il piège certaines ERO telles que l'oxygène singulet, le radical hydroxyle et l'acide hypochlorite, il chélate certains métaux de transition et il participe au recyclage d'autres antioxydants ; la vitamine C et/ou la vitamine E. Il pourrait également augmenter la concentration en glutathion en favorisant la régénération du GSSG (Packer *al.*, 1995).

4.2.3. Oligoéléments

Les oligoéléments servent de cofacteurs aux enzymes antioxydants, ont aussi des propriétés antioxydantes. Des métaux tels que le cuivre (Cu), le zinc (Zn), le manganèse (Mn) et dans certains micro-organismes le nickel (Ni) et le fer (Fe), jouent un rôle important en tant que catalyseur de la SOD. De la même façon le sélénium (Se) et le fer (Fe) sont les éléments catalyseurs de la GPx et la catalase, respectivement (De moffarts et *al.*, 2005).

4.2.4. Polyphénols

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

4.3. Risques des antioxydants

Un antioxydant peut devenir prooxydant et avoir l'effet contraire de celui escompté à partir du moment où la dose ingérée est trop importante, ainsi lors des supplémentations, il ne faut pas dépasser les doses indiquées. Par exemple, La vitamine C est principalement antioxydante, mais en doses trop élevées et dans le processus de défense immunitaire, elle peut exercer un action pro-oxydante au travers de son habilité à réduire l'ion ferrique (Fe³⁺) en ion ferreux (Fe²⁺) qui est un puissant catalyseur de plusieurs réaction redox comme la réaction de Fenton/Haber-Weiss. En augmentant la disponibilité du fer ferreux, la vitamine C

pourrait favoriser les dommages causés à l'ADN (Duarte et *al.*, 2007) et paradoxalement stimuler la réparation de l'ADN oxydé (Duarte et *al.*, 2009). En excès la vitamine A pourrait agir comme pro-oxydants, et favoriser l'oxydation de l'ADN (van Helden et *al.*, 2009). L'augmentation de l'acide urique peut aussi avoir des conséquences pro-oxydantes... (Baillie et *al.*, 2007).

5. IMPLICATION DU STRESS OXYDANT DANS LES PATHOLOGIES

Une production importante d'ERO joue un rôle dans la pathogénèse de nombreuses maladies (Le stress oxydant est impliqué comme facteur déclenchant ou associé à des complications de l'évolution) (figure 9) (Favier, 2003). Ils sont impliqués dans l'ischémie-reperfusion, les maladies neurodégénératives (Maladies d'Alzheimer et de Parkinson,...), les cancers, les rhumatismes et les maladies cardiovasculaire (l'infarctus, l'hypertension et la formation des lésions vasculaires de l'athérosclérose), le diabète, les processus inflammatoires et encore le vieillissement accéléré (Madamanchi et *al.*, 2005).

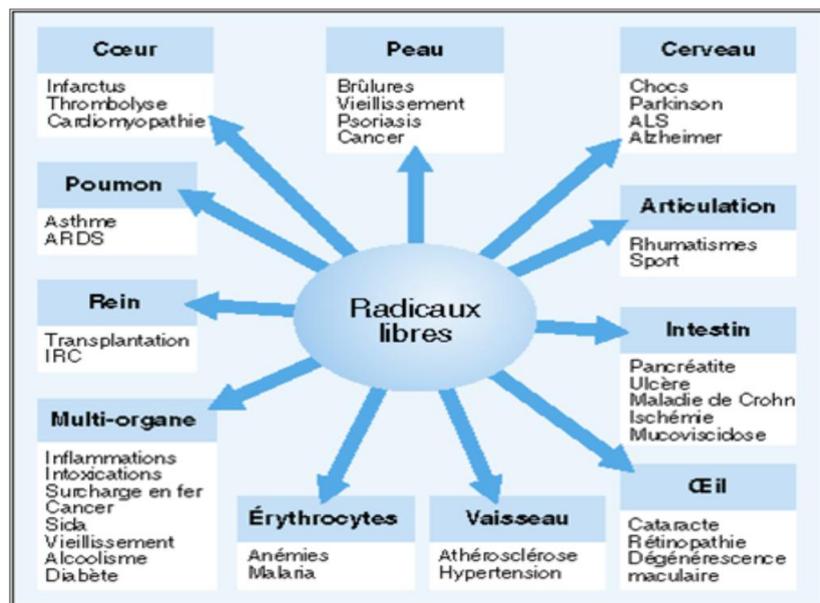
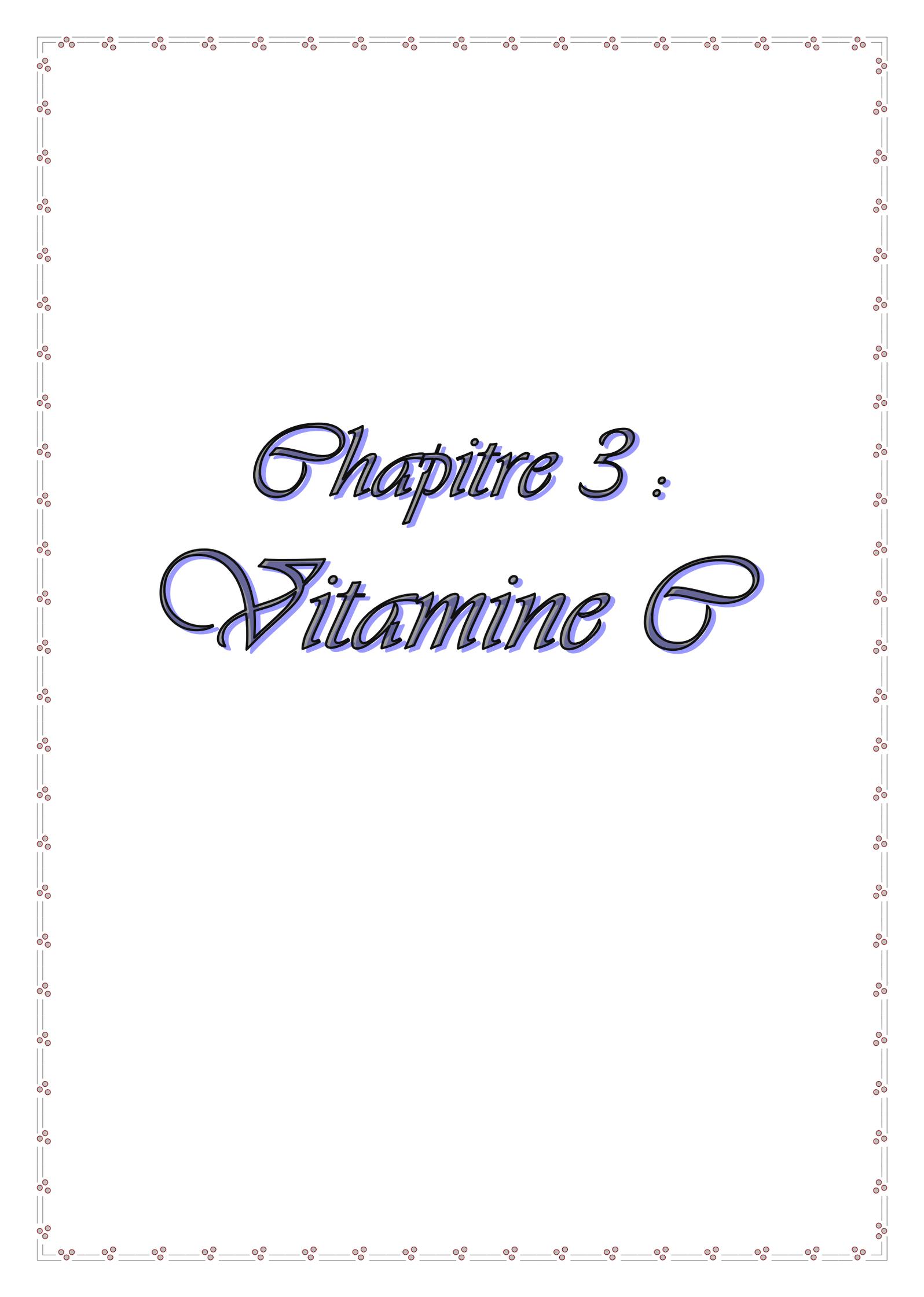


Fig.9 : Exemples d'affections rencontrées chez l'homme causées par les ERO, classées par organe cible (Favier, 1997).

La plupart des maladies induites par le stress oxydant apparaissent avec l'âge car le vieillissement diminue les défenses antioxydantes et augmente la production mitochondriale de radicaux. L'augmentation de l'apport nutritionnel en antioxydant visera donc essentiellement à prévenir ces maladies, de même, une consommation régulière en antioxydant pourrait avoir un effet bénéfique, mais essentiellement préventif (Favier, 2003).



Chapitre 3 :
Vitamine E

VITAMINE C

Notre organisme a besoin, pour son fonctionnement, d'un bon nombre de substances chimiques. Certaines, indispensables à la vie, ne sont pas synthétisées par notre organisme ou en tout cas, pas en quantité suffisante. C'est le cas des **vitamines** donc, elles doivent être apportées par le régime alimentaire dans la quantité recommandée. Elles sont subdivisées en deux groupes en fonction de leur solubilité ; vitamines liposolubles (vitamines A, D, E et K) et hydrosolubles (vitamine C et le complexe de la vitamine B).

Les vitamines agissent de diverses façons. Elles assurent une croissance satisfaisante, aident à la digestion des aliments et à l'utilisation de leurs différents composants, participent à la réparation des cellules endommagées ou usées, aident à lutter contre les maladies.

La vitamine C encore appelée **acide ascorbique** ou **vitamine antiscorbutique** est un composé organique hydrosoluble, découvert en 1924 et isolé la première fois en 1928 par le biochimiste hongrois Albert Von Szent-Györgyi et sa structure a été établie par le biochimiste anglais Sir Walter Norman Haworth en 1933. Ces deux scientifiques reçoivent respectivement le prix Nobel de physiologie et médecine et le prix de Nobel de chimie en 1937 pour leur recherche sur l'acide ascorbique.

C'est une lactone de six-carbone (acide hexuronique) qui est synthétisée à partir du glucose par beaucoup des plantes et d'animaux ; dans le foie chez la plupart des mammifères et dans les reins chez les oiseaux et les reptiles. Cependant, les humains, les primates et quelques autres espèces sont incapables de synthétiser la vitamine C car ils ne possèdent pas la L-gulono- γ -lactone oxydase (**EC 1.1.3.8**) (Gult-ox), l'enzyme qui catalyse la dernière étape dans la voie biosynthétique endogène de l'acide ascorbique parce que le codage du gène pour l'enzyme a subi une mutation substantielle de sorte qu'aucune protéine ne soit produite. Il est donc un nutriment indispensable pour l'homme (Ronald *et al.*, 1999 ; Arrigoni et De Tullio, 2002 ; Padayatty *et al.*, 2003 ; Ball, 2004 ; Iqbal *et al.*, 2004).

1. Propriétés physicochimiques

- Formule chimique : $C_6H_8O_6$;
- Masse molaire : 176.13 g/mol ;
- Température de fusion : 190 à 192°C (décomposition) (Johnston *et al.*, 2001 ; Bourgeois, 2003).

La vitamine C ou acide ascorbique (figure 10) a une structure apparentée à celle des sucres à six atomes de carbone. Elle est constituée d'un cycle lactone portant une fonction ène-diol ($\text{HO-C}=\text{C-OH}$) et deux fonctions alcool.

Il existe plusieurs stéréoisomères de configuration et seul la forme lévogyre (L) ou acide L-ascorbique représentée ci-dessous est active (Bourgeois, 2003 ; Ball, 2004).

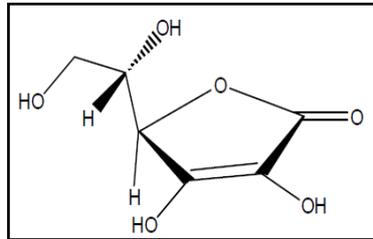
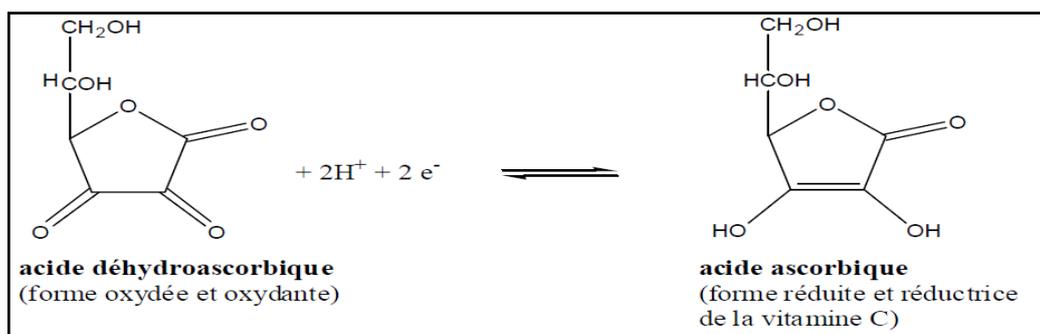


Fig.10 : Acide L-ascorbique.

L'acide ascorbique se présente sous l'aspect d'une poudre cristalline blanche ou très légèrement jaunâtre. Cet acide est très facilement soluble dans l'eau (300g/l), peu soluble dans l'alcool et insoluble dans l'éther ou le chloroforme. La vitamine C est donc une **vitamine hydrosoluble** (Bourgeois, 2003).

2. Propriétés oxydo-réductrices et Stabilité

L'acide ascorbique est le réducteur du couple redox suivant, acide déhydroascorbique de formule chimique $\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_6$ (noté DHA) / acide ascorbique (noté AA) pour lequel la demi-équation redox est :



Dans les tissus, il existe un équilibre entre ces deux formes réduite et oxydée qui possèdent la même activité vitaminique (Bourgeois, 2003).

Cette vitamine est stable à l'état solide, à l'abri de la lumière et de l'humidité. Par contre, en solution aqueuse, elle s'altère très rapidement au contact du dioxygène de l'air : le dioxygène est un oxydant alors que la vitamine C est un réducteur d'où réaction

d'oxydoréduction. Cette oxydation est accélérée par la chaleur (vitamine thermosensible), la présence d'alcalins et d'ions métalliques (Bourgeois, 2003).

3. Les sources de la vitamine C

La vitamine C est très répandue dans la nature. Elle est essentiellement présente dans les végétaux frais, particulièrement dans les agrumes, les fruits frais et les légumes verts.

Comme supplément, la vitamine C est disponible sous formes de comprimé et de poudre de différentes doses. En outre, la vitamine C est incluse dans beaucoup de formulations multivitaminées. La vitamine C est généralement combinée avec d'autres vitamines choisies et le complexe résultant est vendu en tant qu'un supplément « antioxydant » (Padayatty et *al.*, 2003).

4. Le métabolisme de la vitamine C

Dans l'humain et les cobayes, la vitamine C est absorbée au niveau de la muqueuse buccale, l'estomac et principalement l'intestin grêle par un transport actif et une diffusion simple. L'absorption buccale apparue par diffusion passive à travers la membrane de la cavité buccale. Tandis que l'absorption gastro-intestinale est par un mécanisme de transport efficace et actif Na^+ -dépendant qui est saturable et dose dépendant. Les Na^+ -dépendant transporteurs de L-acide ascorbique (SVCTs) et les Hexose transporteurs (GLUTs) sont les deux transporteurs nécessaires pour l'absorption. Les SVCT1 et SVCT2 importent la forme réduite d'ascorbate à travers la membrane plasmique tandis que les GLUT1 et GLUT3 sont les deux transporteurs de glucose et transfèrent seulement l'acide déhydroascorbique.

Avec une prise régulière le taux d'absorption est entre 70 à 95%. Cependant, le processus d'absorption est saturé et le degré diminue à des prises plus élevées. L'acide ascorbique est absorbé à environ 80-90% dans l'appareil gastro-intestinal.

Ensuite, l'acide ascorbique passe rapidement dans le sang et pénètre dans tous les tissus. Dans le sang, la majeure partie de l'acide ascorbique est sous sa forme réduite (environ 85%). Au pH physiologique, la forme majoritaire est l'anion ascorbate AH^- (85%). La forme oxydée (DHA) ne représente que 15 %.

Dans le plasma, la vitamine C circule librement sous forme d'ascorbate (sans transporteur protéique). La concentration plasmatique en acide ascorbique est faible (5 à 15 mg/l) alors qu'elle est 10 à 30 fois plus élevée dans les leucocytes et les plaquettes. La concentration leucocytaire reflète la concentration tissulaire. Les glandes surrénales et l'hypophyse possèdent les plus grandes concentrations tissulaires (30 à 50 mg/100 g) suivi par le foie, la rate, les lentilles, le pancréas, les reins et le cerveau et contiennent entre 10 et 30 mg/100 g. Toutefois, le foie représente l'organe de stockage en vertu de sa taille.

Le pool d'acide ascorbique contenu dans l'organisme est estimé entre 1500 et 3000 mg. Il est affecté par l'absorption limitée intestinale et rénale tubulaire.

La voie principale de l'oxydation et le turnover de l'acide ascorbique est le déplacement de deux électrons en succession pour rapporter d'abord au radical libre l'ascorbyl (A^{\bullet}) et puis le déhydroascorbique. Deux molécules du radical ascorbyl réagissent ensemble et forment une molécule d'ascorbate et une molécule de déhydroascorbique. Alternativement, le radical ascorbyl peut être réduit par une enzyme microsomale NADH-dépendante, mono-déhydro-L-ascorbate oxydoréductase en ascorbate.

L'acide L-ascorbique peut être oxydé réversiblement par l'enzyme L-ascorbate oxydase en acide L-déhydroascorbique. Ce pendant, l'oxydation de l'acide L-déhydroascorbique à l'acide 2,3-dikéto-L-gulonique et l'oxalate est irréversible (figure 11) (Jacob, 1999 ; Ball, 2004 ; Iqbal et *al.*, 2004).

La vitamine C subit une filtration glomérulaire et une réabsorption de 97 à 99.5% de la quantité filtrée.

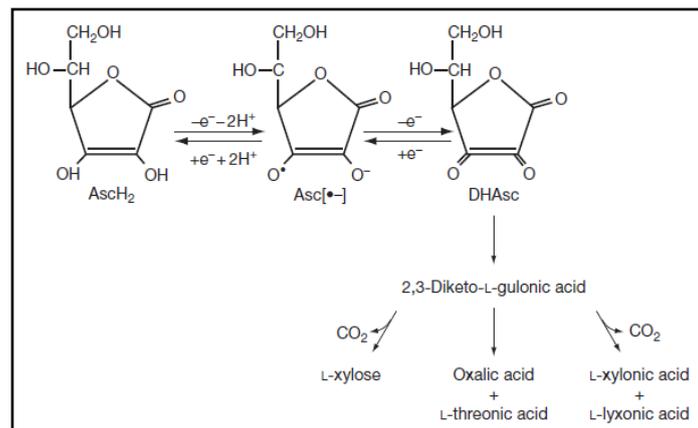


Fig.11 : Voie métabolique de l'ascorbate (Steinberg et Rucker, 2013).

Les voies d'élimination de la vitamine C sont principalement les urines, les matières fécales et la sueur. L'élimination urinaire est majoritaire, la voie fécale est peu importante, sauf lors de diarrhées. L'élimination a lieu sous forme native ou de métabolites incluant l'acide oxalique (le principal métabolite), l'acide thréonique, le L-xylose et l'ascorbate-2-sulphate (Traxer et *al.*, 2003 ; Ball, 2004).

Si de grandes quantités sont ingérées, de fortes concentrations sont décomposées dans la lumière intestinale en composés qui sont dégradés en CO₂, qui est éliminé par exhalation (Ball, 2004).

5. Les rôles physiologiques de la vitamine C

L'acide ascorbique joue plusieurs rôles biochimiques et moléculaires dans l'organisme, notamment grâce à ses propriétés antioxydantes et hydroxylantes. Il intervient dans la synthèse du collagène, de carnitine et des catécholamines. Il participe également au métabolisme de tyrosine, du cholestérol et du fer...

5.1. Fonctions enzymatiques

Chez l'homme, la vitamine C agit en tant que donateur d'électron (agent réducteur) pour huit enzymes différentes qui fonctionnent comme des monooxygénases ou des dioxygénases (Padayatty et *al.*, 2003 ; Ball, 2004) :

- Trois participent à l'hydroxylation de collagène. Ces réactions ajoutent des groupes d'hydroxyle aux acides aminés proline ou lysine, via la prolyle hydroxylase et la lysyle hydroxylase ; nécessitant la vitamine C comme cofacteur et augmentant ainsi la stabilité de la structure triple hélice de la molécule. La vitamine C est donc nécessaire à l'élaboration du collagène, protéine constitutive des fibres des tissus conjonctifs et elle participe à la formation mais surtout à la réparation des structures riches en ces tissus : os, cartilages, ligaments et vaisseaux sanguins.

- Deux autres enzymes hydroxylases à fer ferreux dont un des cofacteurs essentiels est l'acide ascorbique sont nécessaires pour la synthèse de l'acide aminé carnitine à partir de la lysine et de la méthionine. La carnitine est essentielle pour le transport des acides gras dans les mitochondries, où ils sont oxydés pour générer de l'ATP.

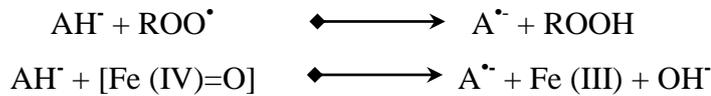
- Les trois enzymes restantes ont les fonctions suivantes :

- ✓ Une participe à la biosynthèse de la norépinephrine à partir de la dopamine ;
- ✓ Une ajoute des groupes amides aux hormones peptidiques, augmentant ainsi leurs stabilités ;
- ✓ Une module le métabolisme de tyrosine.

5.2. Rôle antioxydant

Le rôle antioxydant de l'acide ascorbique découle de ses propriétés réductrices. C'est le plus puissant antioxydant hydrosoluble qui peut travailler à l'intérieur et à l'extérieur des cellules pour combattre les dommages radicalaires. Il est capable de réagir directement avec les espèces réactives oxygénées et azotées en particulier $O_2^{\cdot-}$ et HO^{\cdot} de même que HOCl, H_2O_2 et 1O_2 et les neutralisées (Ball, 2004 ; Iqbal et *al.*, 2004 ; Reichel, 2004).

Il protège les membranes vis à vis de l'attaque peroxydative, en piégeant efficacement les radicaux peroxydes ROO^\bullet dans la phase aqueuse et les complexes oxoferryle, avant qu'ils puissent initialiser les peroxydations :



Il participe à la régénération d'autres antioxydants comme la vitamine E (il contribue donc indirectement dans la prévention des dommages lipidiques) et le glutathion (puissant antioxydant endogène) et les maintenir à leurs états actifs.

Les vitamines C et E travaillent en synergie pour réduire les processus de la peroxydation lipidique.

Il empêche l'oxydation des LDL produites par divers systèmes générateurs d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) (neutrophiles activés, cellules endothéliales activées, myéloperoxydase) (Ball, 2004 ; Iqbal *et al.*, 2004).

La figure 12 montre le schéma de recyclage de l'ascorbate durant le processus de scavenging des RLs (Ball, 2004).

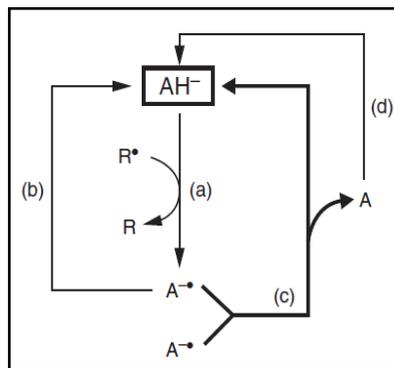


Fig.12 : Schéma montre le recyclage de l'ascorbate pendant le processus de scavenging des RLs (Ball, 2004). L'ascorbate (AH) donne un électron au radical libre (R^\bullet), en formant un produit détoxifié (R) et en oxydant en radical ascorbyl (A^\bullet), également connu comme semidéhydroascorbate (réaction a). Le radical ascorbyl est converti en ascorbate par la semidéhydroascorbate réductase (réaction b). En outre, deux radicaux ascorbyl disproportionnent non-enzymatiquement pour former l'acide déhydroascorbique (A) et l'ascorbate (réaction c). La vitesse rapide de la disproportion du radical ascorbyl empêche des interactions substantielles avec d'autres substances. L'acide déhydroascorbique peut être réduit à l'ascorbate par une GSH-dépendante ou NADPH-dépendante réductase (réaction d).

Son pouvoir antioxydant l'implique dans des mécanismes de défense contre plusieurs pathologies (cancers, cataracte, maladies cardiovasculaire,...) (Ball, 2004 ; Iqbal *et al.*, 2004).

5.3. D'autres rôles (Ball, 2004 ; Iqbal et *al.*, 2004)

- Elle prévient la formation de nitrosamines, potentiellement mutagène, à partir des nitrates et nitrites. Les nitrates sont transformés en nitrites par des bactéries au niveau de l'estomac et ces derniers réagissent avec des amines libres pour donner les nitrosamines. Ces derniers sont des composés susceptibles de provoquer des cancers de l'estomac.
- Elle réduit les réactions allergiques en diminuant le taux d'histamine dans le sang.
- Elle aide le corps à absorber le fer, particulièrement non-hémique des plantes et de l'eau potable par sa capacité de convertir le fer ferrique en ferreux, ce qui contribue à accélérer la formation des globules rouges et donc de diminuer les risques d'anémie.
- Elle intervient dans la conversion du cholestérol en acides biliaires. C'est la principale voie utilisée par l'organisme pour se débarrasser du cholestérol en excès.
- Elle est nécessaire pour la conversion de tryptophane en 5-hydroxy tryptophane et le neurotransmetteur sérotonine.
- Elle contribue au renforcement du système immunitaire, stimule les défenses de l'organisme vis-à-vis des infections microbiennes, possède un effet antiviral et favorise la synthèse de l'interféron.
- Elle participe dans la détoxification des polluants environnementaux répandus comprenant le CO, les hydrocarbures, les pesticides et les métaux lourds en stimulant des enzymes de détoxification dans le foie.

6. Carence en vitamine C

Le déficit en vitamine C (hypovitaminose) provoque une fatigue, des douleurs articulaires et osseuses, une anémie, des retards de cicatrisation, petites hémorragies au niveau capillaire, faible résistance aux infections et souvent la gingivite.

Une carence totale durant une longue période aboutit au scorbut, maladie devenue rare à notre époque et elle est connue depuis l'antiquité. Elle provoque d'abord une grande faiblesse, des douleurs musculaires, puis des saignements des gencives et du nez, une grande sensibilité aux infections, des hémorragies généralisées, la chute des dents et à la fin la mort.

En effet, il suffit de prendre 10 à 15 mg de vitamine C par jour pour le prévenir (à cette dose, le fonctionnement optimal de l'organisme ne sera cependant pas assuré) (Ball, 2004 ; Iqbal et *al.*, 2004).

7. Toxicité de la vitamine C

La toxicité, normalement, ne se produit pas puisque la vitamine C est hydrosoluble et est régulièrement excrétée par voie urinaire, quand tout fonctionne bien.

La toxicité potentielle des doses excessives de supplément en vitamine C se relie aux événements intra-intestinaux et aux effets des métabolites dans le système urinaire. Les prises de 2 ou 3 g/jour produisent de diarrhée désagréable par les effets osmotiques de la vitamine non absorbée en lumen intestinal dans la plupart des personnes. Les perturbations gastro-intestinales peuvent se produire après l'ingestion de moins de 1g parce que approximativement la moitié de cette dose ne serait pas absorbée (Iqbal et *al.*, 2004).

Oxalate est le produit final dans le catabolisme de l'ascorbate et il joue un rôle important dans la formation des calculs dans les reins. Des apports excessifs de la vitamine C produisent une hyperoxalurie, elle est à éviter par ceux qui souffrent de calculs rénaux (Ball, 2004 ; Iqbal et *al.*, 2004).

La toxicité de la vitamine C est remarquablement faible. La DL50 chez les rats est 11.9 g/kg de poids corporel par voie orale.

La vitamine C à forte dose et en présence de quantité importante de fer, peut agir comme prooxydant en réduisant le fer ferrique en fer ferreux (Fe^{+2}) qui réagit ensuite avec le H_2O_2 pour donner le radical hydroxyle selon la réaction de Fenton (Kehrer, 1993 ; Ball, 2004).

Chapitre 4 :

Sélénium

SELENIUM

Les composés minéraux constituent un groupe très hétérogène parmi lesquels on distinguera essentiellement les macro- et les oligo-éléments. Parmi **les oligoéléments essentiels** qui ne sont nécessaires qu'à l'état de traces chez l'homme, on trouve les métaux [le fer (Fe), le zinc (Zn), le manganèse (Mn) et le cuivre (Cu)] et le non-métal [le sélénium (Se)].

Leurs activités biologiques sont fortement associées à la présence des électrons dépareillés qui permettent leur participation aux réactions redox. Dans les systèmes biologiques ces métaux sont la plupart du temps liés aux protéines, formant des métalloprotéines. Ces oligoéléments sont le plus souvent des composés structuraux et des cofacteurs de protéines et de plusieurs enzymes en particulier celles impliquées dans les défenses antiradicalaires et donc ils sont nécessaires pour maintenir la santé humaine.

Intéressons nous plus particulièrement au **Sélénium ; un oligoélément antioxydant**.

Le sélénium (Se) est un élément peu abondant dans l'environnement (élément-trace), mais il est ubiquitaire. Il a été découvert en 1817 par le chimiste suédois Jakob Jöns Berzelius, dans les sous-produits de fabrication d'acide sulfurique (Tinggi, 2003). Son rôle essentiel ne fut décelé qu'en 1957 par Schwarz et Foltz qui démontrèrent son effet préventif de la nécrose du foie par son apport dans l'alimentation chez les animaux déficients en vitamine E. Dès lors, de nombreuses maladies chez l'animal ont été prévenues ou traitées par l'administration de sélénium et/ou de vitamine E. La synergie entre ces deux éléments est bien connue mais le mode d'action du sélénium n'était pas connu. C'est grâce aux travaux de Rotruck et ces collaborateurs en 1973 que le mode d'action de la vitamine E fut séparé de celui du sélénium en découvrant la présence de sélénium dans le site actif de l'enzyme ; la glutathion peroxydase (GPx). Son rôle essentiel chez l'homme ne fut mis en évidence que dans les années 1980 par des supplémentations avec le sélénite de sodium montrant la réversibilité des manifestations cliniques liées à une carence en sélénium (Tinggi, 2003 ; Ducros et Favier, 2004).

1. Propriétés physicochimiques et les variétés du sélénium

De la famille des chalcogènes, le sélénium est un non métal de symbole Se, de numéro atomique 34, du groupe VI et de période 4 dans le tableau périodique possédant à la fois des propriétés métallique et non métallique, considéré donc comme un métalloïde, chimiquement proche du soufre et apparenté au tellure (Tinggi, 2003).

La masse molaire du sélénium élémentaire est de 78.96 g/mol. De densité 4.80, ses températures de fusion et d'ébullition sont respectivement de 217°C et 685°C (Thérond et *al.*, 1997).

A température ambiante, il se présente sous forme solide, stable, insoluble dans l'eau et les solvants organiques usuels. Le sélénium est allotropique et existe sous différentes formes physiques : Le sélénium amorphe ; rouge foncé, le sélénium vitreux ; d'une masse amorphe et le sélénium gris ou sélénium métallique considérée comme la forme la plus stable (Burk, 1994).

Il est présent dans la nature sous plusieurs formes isotopiques et existe sous quatre états de valence : -II (séléniure), 0 (sélénium élémentaire), +IV (sélénite) et +VI (séléniate) (Ducros et Favier, 2004).

Il existe différentes formes organiques et inorganiques du sélénium qui sont présentées dans le tableau 4 (Simonoff et Simonoff, 1991) et possèdent des propriétés différentes.

Tab.4 : Principales formes chimiques des composés naturels séléniés.

Dénomination	Formule chimique	Etat de valence	Abréviation
Composés inorganiques			
Sélénite	$H_2SeO_3, HSeO_3^-, SeO_3^{2-}$	Se(+IV)	
Séléniate	$H_2SeO_4, HSeO_4^-, SeO_4^{2-}$	Se(+VI)	
Sélénium élémentaire		Se(0)	
Séléniure	H_2Se, HSe^-, Se^{2-}	Se(-II)	
Composés organiques			
Sélénométhionine	$CH_3Se(CH_2)_2CHNH_2COOH$		Se-Met
<i>Homologue de la méthionine</i> (acide aminé soufré)			
Sélocystéine	$SeCH_2CHNH_2COOH$	Se(-II)	Se-Cys
<i>Homologue de la cystéine</i> (acide aminé soufré)			
Diméthylséléniure	$(CH_3)_2Se$		DMSe
Diméthyldiséléniure	$(CH_3)_2Se_2$		DMDSe
Ion triméthylsélénonium	$(CH_3)_3Se^+$		TMSe

2. Usages industriels du sélénium

Le sélénium possède un large spectre d'utilisation : de l'agriculture aux procédés industriels high-tech. Ainsi, il est employé dans (Simonoff et Simonoff, 1991) :

- L'industrie électrique et électronique pour la fabrication de redresseurs de courants, de cellules photoélectriques, de tambours de photocopieurs ;
- L'industrie métallurgique pour la préparation d'alliages facilement usinables et résistant à la corrosion et le traitement de surface des métaux ;
- L'industrie des lubrifiants comme additifs pour la fabrication d'huiles lubrifiantes ;
- L'industrie du verre et de la céramique pour la décoloration et la pigmentation ;
- L'industrie chimique comme catalyseurs ;
- L'industrie des peintures et vernis comme pigments inorganiques ;
- L'industrie du caoutchouc pour la vulcanisation du caoutchouc en présence de soufre ;
- L'industrie alimentaire et pharmaceutique comme suppléments alimentaires pour l'homme ;
- L'agriculture comme fertilisants et suppléments alimentaires pour l'animal.

3. Les sources du sélénium

Le sélénium dans l'aliment constitue la principale source naturelle suivie par l'eau, et est considéré comme un oligo-élément essentiel pour la nutrition humaine et animale (Tinggi, 2008).

Le sélénium se localise dans la fraction protéique de la plante et le tissu animal.

Le Se sous forme de séléniate ou de sélénite est absorbé et principalement convertit en Se-méthionine (Se-Met) par les plantes et l'incorporent à la protéine à la place de la méthionine. Cette absorption dépend principalement de la concentration et des formes physico-chimiques existant dans le sol (Tapiero et *al.*, 2003 ; Navarro-Alarcon et Cabrera-Vique, 2008).

Le teneur en Se des plantes est directement influencé par leur niveau dans le sol dans lequel sont développées qui varie régionalement, tandis que le teneur en Se des produits animaux reflète leur niveau dans leur régime consommé (Tapiero et *al.*, 2003 ; Navarro-Alarcon et Cabrera-Vique, 2008).

En général, les céréales, les grains entiers, l'ail, les germes de blé, la viande rouge, les fruits de mer, les poissons, les œufs, les volailles, le foie et certaines levures sont tous de bonnes sources de sélénium, alors que des niveaux bas sont trouvés en lait, légumes et fruit (Navarro-Alarcon et Cabrera-Vique, 2008 ; Tinggi, 2008).

Plusieurs auteurs ont considéré que la supplémentation en Se peut être bénéfique pour les individus des régions avec des niveaux environnementaux faibles (Simonoff et Simonoff,

1991 ; Chan et *al.*, 1998 ; Grashorn, 2006). Dans quelques secteurs où le niveau du Se du sol est bas ; différentes stratégies ont été suivies pour fournir un taux suffisant du Se pour la population : (a) Utilisation des engrais enrichis en Se ; (b) Supplémentation des animaux de ferme avec le Se ; (c) Prise humaine des suppléments multi-micronutriments contenant du Se (Navarro-Alarcon et Cabrera-Vique, 2008).

4. Métabolisme du sélénium

4.1. Voies d'absorption

4.1.1. Absorption pulmonaire

Par cette voie, l'apport est estimé à 4.2 ng/j ce qui est négligeable (Mahapatra et *al.*, 2001). Cependant, en cas d'exposition professionnelle, cette voie peut devenir importante.

4.1.2. Absorption cutanée

Comme dans le cas précédent, en dehors d'une exposition professionnelle, les contacts cutanés ne sont pas un mode majeur d'exposition.

4.1.3. Absorption digestive

Plusieurs formes du Se présentes dans la nourriture sont habituellement bonnes absorbées dans l'intestin des êtres humains (50 à 100%) (Navarro-Alarcon et Cabrera-Vique, 2008) et ne semble pas soumise à un contrôle homéostatique (Gammelgaard et *al.*, 2008). Cette absorption dépend de la forme chimique qui implique un mécanisme d'absorption différent :

- La *L-sélénométhionine* : est absorbée dans l'intestin grêle par un mécanisme actif propre aux acides aminés (Na^+ dépendant), avec le même transporteur que pour la *L-méthionine*, celui des acides aminés neutres (Tapiero et *al.*, 2003).
- Le séléniate est absorbé dans l'iléon par un mécanisme de transport actif identique à celui des sulfates (Navarro-Alarcon et Cabrera-Vique, 2008).
- Le sélénite est absorbé par simple diffusion mais son absorption est stimulée par la présence de nutriments à groupements thiols comme le glutathion ou la cystéine (Ducros et Favier, 2004).
- Concernant la sélénocystéine n'est pas absorbée par un transport actif (Navarro-Alarcon et Cabrera-Vique, 2008).

Il semble que les formes organiques sont mieux absorbées (75 à 90%) que les formes inorganiques (45-70%) (Simonoff et Simonoff, 1991). Parmi les Se inorganiques, l'absorption des séléniates serait supérieure à celle des sélénites (Dodig et Cepelak, 2004).

4.2. Distribution

La teneur en sélénium du corps humain d'un adulte varie entre 3 et 20 mg (Ducros et Favier, 2004 ; Navarro-Alarcon et Cabrera-Vique, 2008).

Après absorption intestinale, le sélénium est capté par le foie ou les globules rouges. Dans les érythrocytes, le sélénium est réduit et libéré dans le plasma sous forme différente (sélénodiglutathion ou séléniure) où il se lie non spécifiquement à des protéines.

Trois entités transportant le sélénium plasmatique sont aujourd'hui distinguées : les sélénoprotéines non spécifiques, la sélénoprotéine P (plus de 50%), et la glutathion peroxydase (12-15%) (Ducros et Favier, 2004 ; Navarro-Alarcon et Cabrera-Vique, 2008).

Dans l'organisme, le sélénium se localise surtout dans les organes suivants (Simonoff et Simonoff, 1991 ; Ducros et Favier, 2004) :

- Le foie qui contient environ 30% du sélénium total et qui joue un rôle principal dans le métabolisme du sélénium. Il constitue une zone d'échange rapide avec le sang.
- Les reins qui présentent la concentration séléniée la plus élevée (principal lieu de synthèse de la glutathion peroxydase plasmatique).
- Les muscles squelettiques, qui de part leur proportion dans l'organisme, semblent être le site privilégié de stockage (environ 50% du sélénium corporel total). Le sélénium présent est lentement échangé avec le sang. Il semble également nécessaire pour leur fonction.
- Les glandes endocrines (les testicules présentent la 3^{ème} concentration la plus élevée après les reins et le foie).

4.3. Métabolisme

La Figure 13 présente les voies métaboliques proposées du sélénium chez l'homme.

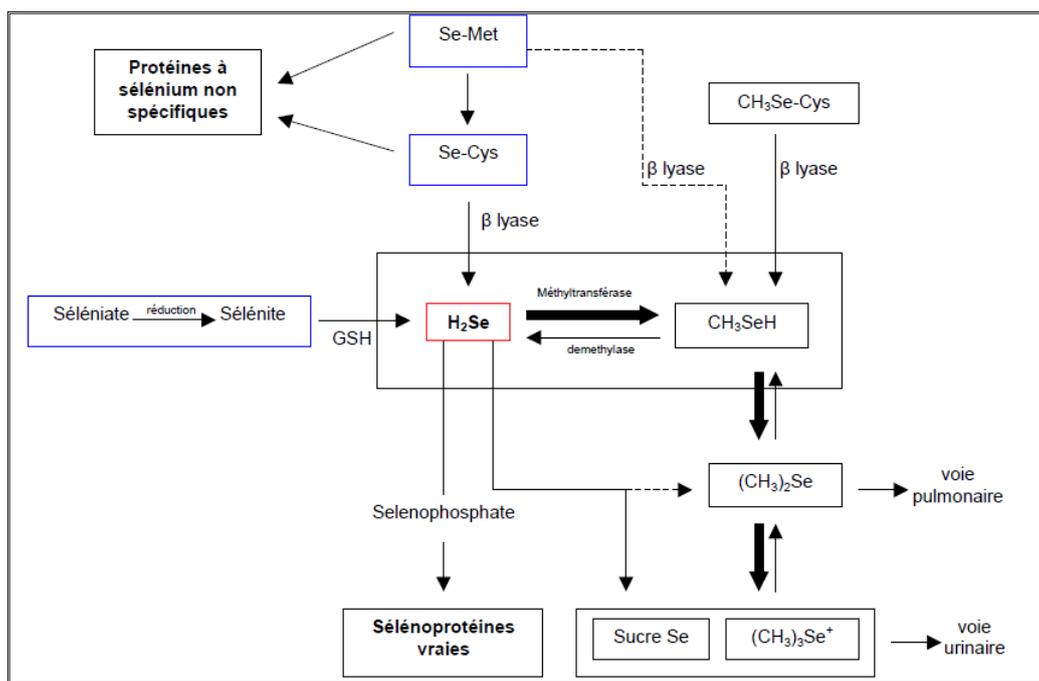


Fig.13 : Métabolisme des espèces sélénées chez l'homme (adapté de Letavayova et *al.*, 2006 ; Navarro-Alarcon et Cabrera-Vique, 2008). Se-Met : Sélénométhionine, Se-Cys : Sélénocystéine, H₂Se : Séléniure, CH₃Se-Cys : Se-méthylsélénocystéine, CH₃SeH : Méthylséléniure, (CH₃)₂Se : Diméthylséléniure, (CH₃)₃Se⁺ : Ion triméthylsélénonium, Sucre Se : Sélénosucres.

En général, le corps humain métabolise les diverses formes de Se en séléniure selon diverses voies et qui semble être le point commun pour régler le métabolisme de Se. La Se-Met peut être métabolisée par la voie analogue à celle de la méthionine ou par trans-sulfuration *via* la formation de sélénocystathionine et de sélénocystéine. La Se-Cys est métabolisée en séléniure par la β-lyase. Les sélénates sont réduits en sélénites qui sont ensuite métabolisés en séléniure *via* la formation de sélénodiglutathion (GS-Se-GS). Ce séléniure peut être transformé en sélénophosphate (HSePO₃²⁻) et incorporé dans la chaîne polypeptidique des sélénoprotéines sous forme de sélénocystéine (considérée comme le 21^{ème} acide aminé) (Brenneisen et *al.*, 2005 ; Navarro-Alarcon et Cabrera-Vique, 2008).

4.4. Elimination

Le sélénium non absorbé ou issu des sécrétions digestives est éliminé dans les fèces et représente la seconde voie d'élimination. Cette voie représente environ 35% du taux de sélénium éliminé (Navarro-Alarcon et Cabrera-Vique, 2008).

La voie urinaire constitue la principale voie d'élimination (environ 60% du sélénium total éliminé). L'homéostasie du sélénium est d'ailleurs en partie régulée par l'excrétion rénale (Gammelgaard et *al.*, 2008). Cette excrétion se fait sous forme d'ion

triméthylsélénonium (TMSe) soluble (après méthylation) ou de sélénosucres. De fortes concentrations saturant la voie d'excrétion urinaire, des composés volatils (diméthylséléniure ou diméthyldiséléniure) sont alors formés et excrétés par les poumons (Navarro-Alarcon et Cabrera-Vique, 2008).

5. Les rôles physiologiques du sélénium

Le sélénium joue un rôle capital chez les mammifères et est considéré comme un élément essentiel. Sa fonction a été mieux appréhendée lorsque Rotruck et ses collaborateurs en 1973 ont découvert qu'il constitue un composant intégral du site actif de GPx. Dès lors, les propriétés biologiques de l'élément ont été élucidées.

Il intervient dans de nombreux processus biologiques antioxydants. A ce titre il aide au maintien de l'intégrité cellulaire. C'est donc un facteur fondamental de la protection cellulaire.

Chez les êtres humains, le sélénium est incorporé sous forme de sélénocystéine dans le site actif de 25 sélénoprotéines avec plusieurs fonctions biologiques essentielles s'étendant des rôles antioxydants et anti-inflammatoires à la production d'hormone thyroïdienne active (Rayman, 2012).

5.1. Les sélénoprotéines

5.1.1. Les glutathion peroxydases (GPx)

Ce sont des sélénoenzymes antioxydantes essentielles de l'organisme. Les GPx réduisent le peroxyde d'hydrogène ou des hydroperoxydes lipidiques et phospholipidiques en substances non dangereuses (eau et alcool). Cette fonction permet de réduire la propagation des dommages oxydatifs à des biomolécules nobles (lipides, lipoprotéines et ADN) et de maintenir l'intégrité membranaire (Tapiero et *al.*, 2003). L'activité enzymatique est directement proportionnelle à l'apport en sélénium (Ducros et Favier, 2004).

Le cycle catalytique de GPx a été bien étudié (figure 14) et implique l'acide sélénénique (PSeOH) (la protéine est indiquée par P) réagissant avec GSH en générant le produit intermédiaire sélénényl-sulfure (PSeSG) qui va réagir avec un 2^{ème} GSH pour produire le sélénol actif (PSeH) qui réduit le peroxyde (Mugesh et *al.*, 2001).

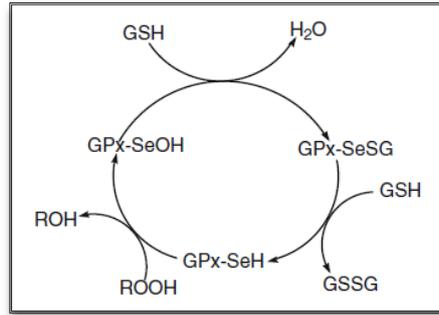


Fig.14 : Le cycle catalytique de GPx (Mugesh et *al.*, 2001).

5.1.2. Les iodothyronine déionidases (DI)

Ces sélénoprotéines jouent un rôle dans le métabolisme des hormones thyroïdiennes.

Trois isozymes ont été identifiées (5'DI, 5'DII et 5'DIII) (Rayman, 2012) :

- La 5'DI et la 5'DII convertissent la prohormone thyroxine (T4) en triiodothyronine (T3), forme hormonale active au niveau des tissus.
- La 5'DIII désactive la thyroxine en son métabolite inactif (reverse T3) et assure la conversion de T3 en diiodothyronine. Elle a surtout une activité au niveau fœtal.

5.1.3. Les thiorédoxine réductases (TRs)

Le système thiorédoxine (composé de la TR, de la thiorédoxine et du NADPH) constitue un système redox cellulaire majeur présent dans tous les organismes vivants (Tapiero et *al.*, 2003). Parmi ces rôles, on note (Tapiero et *al.*, 2003) :

- La régulation de plusieurs procédés cellulaires d'oxydo-réduction ;
- La stimulation de la croissance des cellules ;
- L'intervention dans la synthèse d'ADN.

Trois isozymes de TRs ont été identifiées (Rayman, 2012) :

- La TR1 (cytoplasmique/nucléaire) : Contrôle l'activité des facteurs de transcription, la prolifération cellulaire et l'apoptose ;
- La TR2 (mitochondriale) : Indispensable pour la viabilité de cardiomyocyte ;
- La TR3 (testiculaire) : Leur rôle n'a pas encore été complètement élucidé.

5.1.4. Autres sélénoprotéines

- La sélénoprotéine P est principalement localisée dans le plasma. De par sa localisation (sélénoprotéine majeure dans le plasma) et sa richesse en sélénium (dix atomes de sélénium par protéine), on lui suppose un rôle de transporteur (porteur de 60% de Se de plasma). Elle agit aussi en tant qu'antioxydant extracellulaire lié à l'endothélium vasculaire en diminuant le taux de peroxynitrite (ONOO⁻), prévenir l'oxydation des LDL (Navarro-Alarcon et Cabrera-Vique, 2008).

- La sélénophosphate synthétase catalyse la synthèse du sélénomonophosphate (précurseur de la sélénocystéine) et permet l'incorporation de la sélénocystéine dans les sélénoprotéines.
- La sélénoprotéine W est exprimée dans les cellules musculaires squelettiques et cardiaques (Tapiero et *al.*, 2003).

5.2. Rôle détoxifiant

Le Sélénium diminue la gravité des lésions produites par les métaux toxiques comme le mercure, l'arsenic, le cadmium (cancer du rectum), l'argent et le plomb. Cette protection est expliquée par formation de complexes métal-séléniure biologiquement inactifs (Ducros et Favier, 2004).

5.3. D'autres rôles

Les autres rôles sont détaillés dans la figure 15 qui représente les effets bénéfiques du Se sur la santé.

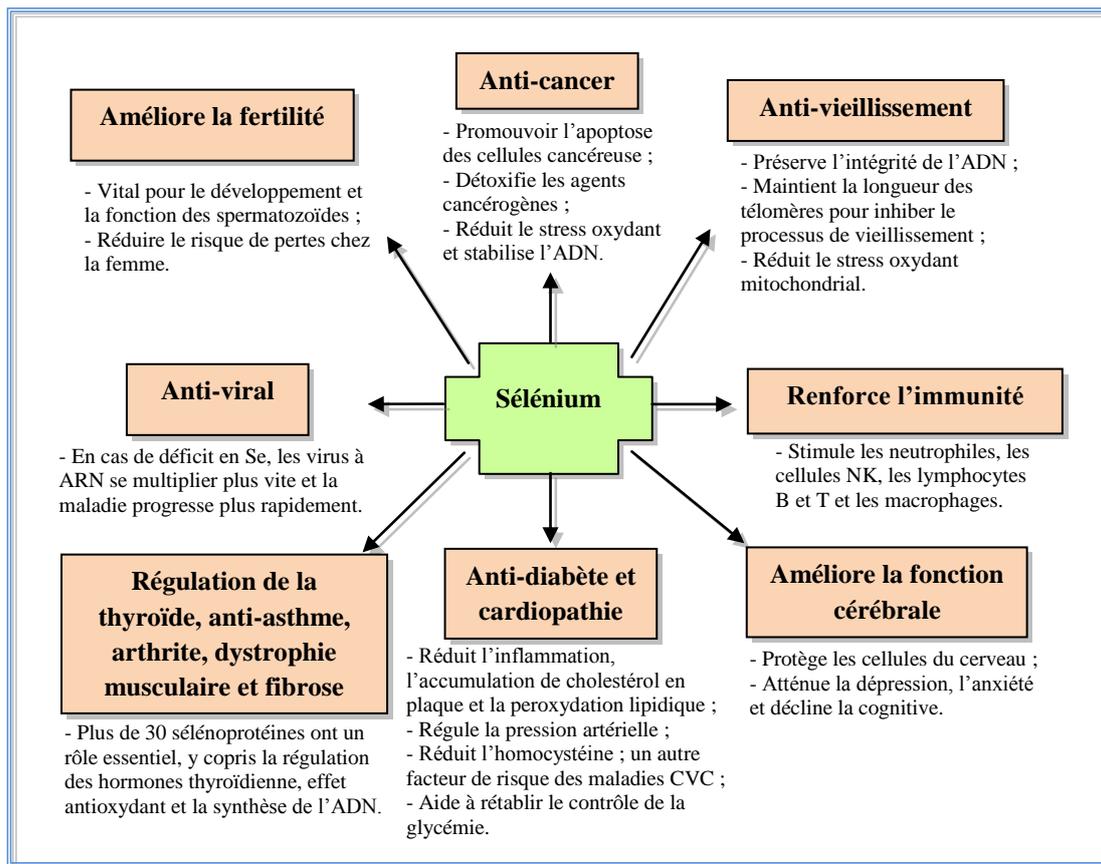


Fig.15 : Effets bénéfiques du sélénium sur la santé (résumé de Tinggi, 2008).

6. Carence en sélénium

Le sélénium est un élément essentiel en nutrition humaine étroitement liée à la santé de la population.

Les carences vraies en sélénium se rencontrent lorsque les apports alimentaires quotidiens sont très faibles, en particulier pour des zones sélénoprives (sols pauvres en sélénium) (Navarro-Alarcon et Lopez-Martinez, 2000).

Deux maladies ont été associées à une carence endémique sévère en sélénium (Navarro-Alarcon et Cabrera-Vique, 2008) :

- *La maladie de Keshan* : Cette pathologie est une cardiomyopathie juvénile (une maladie dégénérative cardiaque). A noter que dans l'étiologie de la pathologie, la déficience en sélénium ne serait pas le seul facteur en cause mais impliquerait également une infection par un enterovirus Coxsackie ;
- *La maladie de Kaschin-Beck* : Cette pathologie est caractérisée par des malformations au niveau des os et des articulations. Une déficience combinée de sélénium et d'iode peut être un facteur à l'origine de cette pathologie.

En clinique, un ou plusieurs des symptômes suivants peuvent être observés lors d'une carence : dystrophie des muscles squelettiques, dépigmentation des phanères, anémie, manifestations arthrosiques, retard de développement neurologique, fréquence accrue d'infections, voire arythmie cardiaque. Ils sont généralement réversibles par administration de sélénium (Ducros et Favier, 2004).

7. Toxicité du sélénium

Les effets toxique du sélénium ont été connus bien avant que son rôle nutritionnel comme élément trace ne soit découvert et ceci dès 1930s. La frontière entre concentrations en Se physiologiquement essentielles et toxiques est très étroite.

A forte concentration, le sélénium peut devenir un pro-oxydant. Le caractère pro-oxydant du sélénium provient de la génération d'anions superoxydes due à l'interaction du sélénium avec des groupements thiols (Letavayova et *al.*, 2006). La toxicité du sélénium peut aussi être due au remplacement du soufre par le sélénium lors de la synthèse de protéines (Théron et *al.*, 1997).

Les cas intoxication aiguë chez l'homme rapportés dans la littérature sont rares, mais peuvent être mortels. Ils sont majoritairement d'origine accidentelle ou criminelle. A partir des données obtenues chez l'animal, la DL50 a été estimée entre 0.5 et 1 g/j de sélénium minéral (sélénite ou sélénate de sodium) (Théron et *al.*, 1997).

La toxicité chronique de Se chez l'homme a comme conséquence la sélérose (Goldhaber, 2003) caractérisée par la perte de cheveux, les changements et la fragilité des ongles, les troubles gastro-intestinales (diarrhées), des signes neurologiques (convulsions, coma), des irritations cutanées, des troubles respiratoires et une odeur alliacée de l'haleine (Navarro-Alarcon et Cabrera-Vique, 2008). Ces symptômes apparaissent entre 2400 et 3000 μ g (Théron et *al.*, 1997).



Etude expérimentale



Matériel et méthodes

MATERIEL ET METHODES

I. TRAITEMENT DES RATS

1.1. Matériel biologique

Dans notre étude, nous avons utilisé 40 rats blancs mâles *Rattus rattus* de la souche Wistar, provenant de l'institut Pasteur (Centre d'élevages ElKouba, Alger), âgés de neuf semaines et ayant un poids corporel entre 200 et 250 g. Ce sont des mammifères de l'ordre des rongeurs, largement utilisés dans divers domaines de recherche. Ces rats ont été soumis à une période d'adaptation de 15 jours environ, aux conditions de l'animalerie, à une température voisine de 25°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 2 jours jusqu'à la fin de l'expérimentation. Ils ont été nourris avec un concentré équilibré (ONAB, ANNABA) en protéines, glucides, lipides, vitamines et sels minéraux.

1.2. Traitement des rats

Les rats mâles ont été repartis en 5 groupes de 8 rats chacun, il s'agit de :

- **Groupe 1** : rats témoins ont reçu une eau physiologique par injection intrapéritonéale. Ce traitement s'est poursuivi pendant 3 semaines.
- **Groupe 2** : rats traités par le méthomyl (MET) dissout dans l'eau de boisson. Le méthomyl est administré aux rats par voie orale à raison de 8 mg/kg de poids corporel (en se basant sur l'étude précédente de Fayez et Bahig, 1991) chaque jour pendant 3 semaines du traitement.
- **Groupe 3** : rats traités par le méthomyl avec la même dose que celle du groupe 2 avec supplémentation quotidienne en sélénite de sodium $\text{Na}_2\text{O}_3\text{Se}$ (Se) à raison de 0.6 mg/100g de poids corporel (en se basant sur l'étude précédente de Chattopadhyay et al., 2003) dans l'alimentation pendant 3 semaines.
- **Groupe 4** : rats traités par le méthomyl avec la même dose que celle du groupe 2 avec supplémentation quotidienne par injection intrapéritonéale en vitamine C (Vit C) à

raison de 200 mg/kg de poids corporel (en se basant sur l'étude précédente de Fetoui et *al.*, 2010) pendant 3 semaines.

- **Groupe 5** : rats traités par le méthomyl avec la même dose que celle du groupe 2 avec supplémentation quotidienne en sélénite de sodium et supplémentation quotidienne en vitamine C avec la même dose que celle des groupes 3 et 4, respectivement pendant 3 semaines.

II. PRELEVEMENTS DES ECHANTILLONS

Après 3 semaines de traitement les 5 groupes de rats sont sacrifiés (par décapitation).

2.1. Prélèvement sanguin

Le sang est immédiatement recueilli dans des tubes polyéthylènes étiquetés contenant l'anticoagulant EDTA.

Ces tubes vont subir une centrifugation 3000 tours/min pendant 15 min, puis on récupère le plasma résultant. Les échantillons obtenus ont été stockés au congélateur, à -20°C pour le dosage ultérieur des paramètres biochimiques (glucose, urée, créatinine, bilirubine, cholestérol, triglycérides, transaminases et phosphatase alcaline,...).

2.2. Prélèvement des organes

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

- Le foie, les reins et le cerveau débarrassés de son tissu adipeux ont été pesés puis stockés au congélateur pour le dosage des paramètres du stress oxydant ;
- Une partie du foie est fixée dans le Bouin alcoolique afin de réaliser des coupes histologiques ;
- La thyroïde avec la trachée débarrassée de son tissu adipeux a été pesée.

La Figure 16 schématise les différentes étapes du protocole expérimental utilisé.

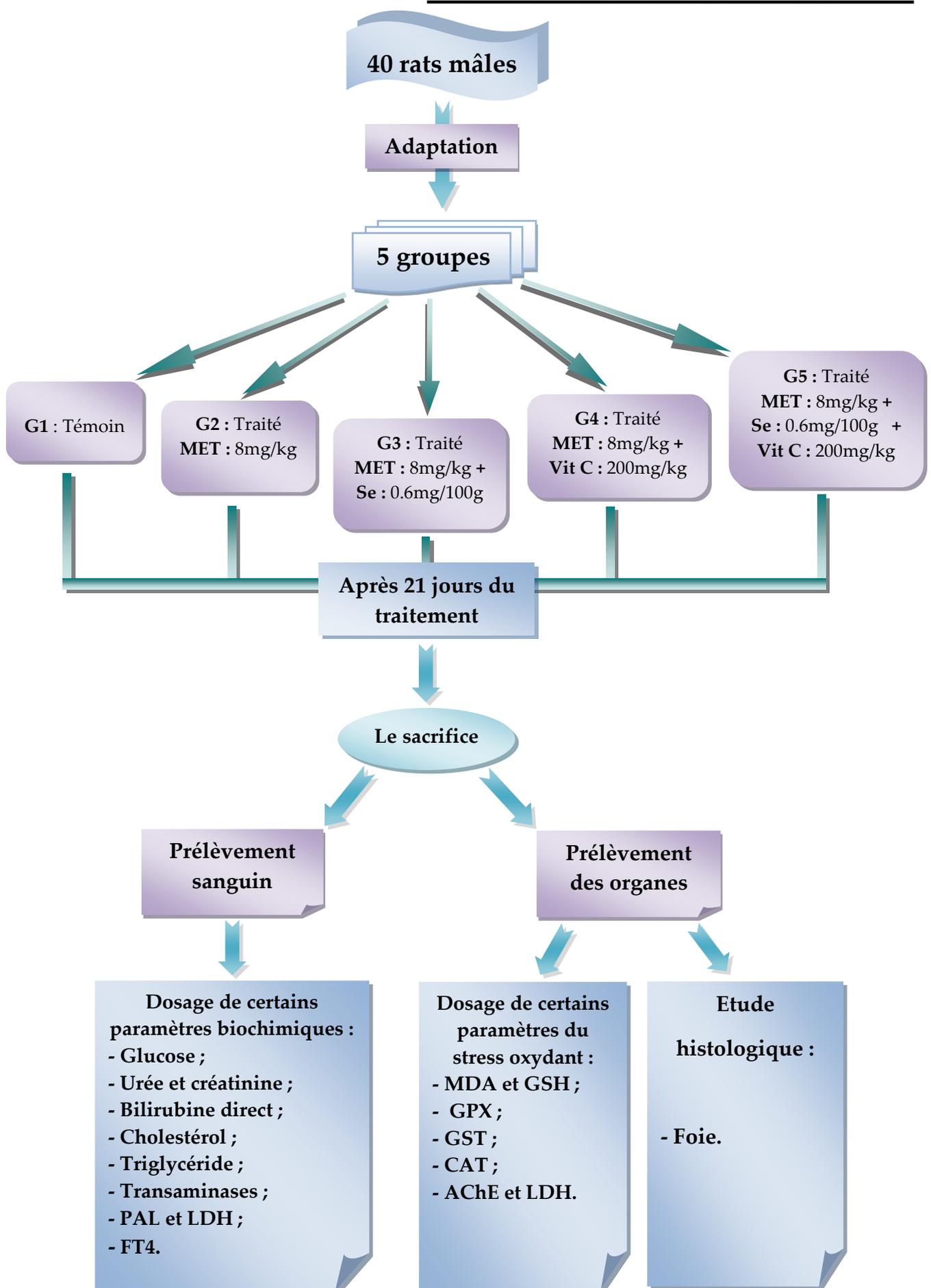


Fig.16 : Schéma récapitulatif du protocole expérimental.

III. TECHNIQUES DE DOSAGE

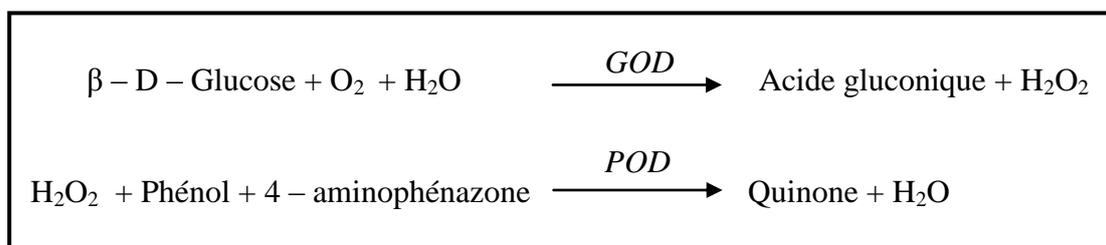
3.1. Exploration de la fonction hépatique

3.1.1. Dosage du glucose sanguin

La détermination de la glycémie a été réalisée par la méthode enzymatique au glucose oxydase (selon la fiche technique Spinreact).

- Principe

Le glucose est transformé par la glucose oxydase (GOD) en acide gluconique et peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Ce dernier, en présence de peroxydase (POD), oxyde le chromogène incolore (4-aminophénazone) en un composé coloré en rouge-violet (quinoneimine) (Kaplan, 1984), selon les réactions suivantes :



- Réactifs

Réactif 1 : Tampon	Tris pH 7.4	92 mmol/L
	Phénol	0.3 mmol/L
Réactif 2 : Enzymes	Glucose oxydase (GOD)	15000 U/L
	Peroxydase (POD)	1000 U/L
	4-Aminophenazone (4-AP)	2.6 mmol/L
Glucose calibrant	Glucose aqueux (standard) 100 mg/dL	

- **Réactif de travail** : Dissoudre le contenu du réactif 2 dans le flacon du réactif 1 et mélanger légèrement.

- 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°C, ou 15 à 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.

- Calcul de la concentration

La concentration du glucose est calculée par la formule suivante :

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

3.1.2. Dosage de la bilirubine directe plasmatique

La détermination de la bilirubine a été réalisée par la méthode colorimétrique (selon la fiche technique Spinreact).

- Principe

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 est indirecte nécessite la solubilisation par le diméthylsulfoxyde (DMSO) (En absence de DMSO, seule la bilirubine directe réagit).

L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration de la bilirubine dans l'échantillon (Kaplan et *al.*, 1984).

- Réactifs

Réactif 1 : Bilirubine directe	Acide sulfanilique	30 mmol/L
	Acide chlorhydrique (HCl)	150 mmol/L
Réactif 2	Nitrite de sodium	29 mmol/L
Calibrant	Il est sous la référence : 1002250	

- Mode opératoire

	Blanc	BL directe
Réactif 1 : BL directe (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.

- Calcul de la concentration

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

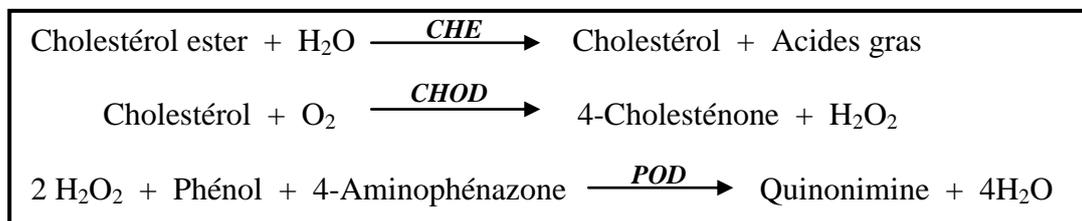
$$\text{Bilirubine directe} = \frac{\text{DO}_{\text{échantillon}} - \text{DO}_{\text{blanc échantillon}}}{\text{DO}_{\text{calibrant}} - \text{DO}_{\text{blanc calibrant}}} \times \text{concentration de calibrant}$$

3.1.3. Dosage du cholestérol plasmatique

Nous avons utilisé des coffrets (Spinreact) pour réaliser ce dosage.

- Principe

Le cholestérol présent dans l'échantillon forme un complexe coloré (Naito, 1984), selon les réactions ci-dessous :



L'intensité de la couleur formée est proportionnelle à la concentration du chlore dans l'échantillon.

- Réactifs

Réactif R1 : Tampon	PIPES pH 6.9	90 mmol/L
	Phénol	26 mmol/L
Réactif R2 : Enzymes	Cholestérol estérase (CHE)	300 U/L
	Cholestérol oxydase (CHOD)	300 U/L
	Peroxydase (POD)	1250 U/L
	4-Aminophénazone (4-AP)	0.4 mmol/L
Cholestérol calibrant	Cholestérol aqueux (standard) 200 mg/dL	

- **Réactif du travail** : dissoudre le contenu de réactif 2 (enzymes) dans un flacon de réactif 1 (tampon).

- Mode opératoire

	Blanc	Tampon	Echantillon
Réactif du travail (ml)	1.0	1.0	1.0
Tampon (µl)	--	10	--
Echantillon (µl)	--	--	10

- Mélanger et incuber pendant 10 min à la température ambiante.
- Lire l'absorbance de l'échantillon et de l'étalon à 505 nm contre le blanc.

- Calcul de la concentration

La concentration du cholestérol est calculée par la formule suivante :

$$\text{Cholestérol (mg/dL)} = \frac{\text{DO échantillon}}{\text{DO étalon}} \times 200$$

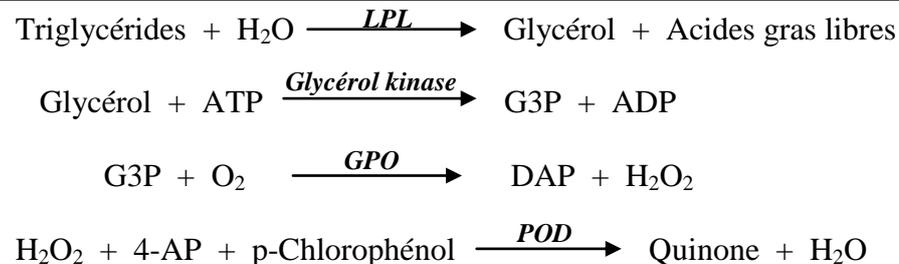
3.1.4. Dosage des triglycérides plasmatiques

Nous avons utilisé des coffrets (Spinreact) pour réaliser ce dosage.

- Principe

L'incubation des triglycérides de l'échantillon avec la lipoprotéinlipase (LPL) libère le glycérol et des acides gras. Le glycérol est convertit en glycérol-3-phosphate (G3P) et adénosine diphosphate (ADP) par la glycérol kinase et l'ATP. Le glycérol-3-phosphate (G3P) est en suite convertit par la glycérol phosphate déshydrogénase (GPO) en dihydroxyacétone phosphate (DAP) et peroxyde d'hydrogène (H₂O₂).

Dans la réaction finale, le peroxyde d'hydrogène réagit avec 4-aminophénazone (4-AP) et le p-chlorophénol en présence de peroxydase (POD) pour donner une couleur verte (Kaplan et *al.*, 1984).



L'intensité de la couleur formée est proportionnelle à la concentration des triglycérides dans l'échantillon.

- Réactifs

Réactif R1 : Tampon	COOD pH 7.5	50 mmol/L
	p-Chlorophénol	2 mmol/L
Réactif R2 : Enzymes	Lipoprotéine lipase (LPL)	150000 U/L
	Glycérol kinase (GK)	500 U/L
	Glycérol-3-oxydase (GPO)	2500 U/L
	Peroxydase (POD)	440 U/L
	4-Aminophénazone (4-AP)	0.1 mmol/L
	ATP	0.1 mmol/L
Triglycérides calibrant	Triglycérides aqueux (standard) 200 mg/dL	

- **Réactif du travail** : Dissoudre le contenu d'une fiole de réactif 2 (enzymes) dans une bouteille de réactif 1 (tampon).

- Mode opératoire

	Blanc	Tampon	Echantillon
Réactif du travail (ml)	1.0	1.0	1.0
Tampon (µl)	--	10	--
Echantillon (µl)	--	--	10

On mélange et on laisse incuber pendant la température ambiante pendant 10 min, puis on lit l'absorbance de l'échantillon et de l'étalon contre le blanc. La coloration est stable pendant 30 minutes.

- Calcul de la concentration

La concentration des triglycérides est calculée par la formule suivante :

$$\text{Concentration des triglycérides (mg/dl)} = \frac{\text{DO}_{\text{échantillon}}}{\text{DO}_{\text{étalon}}} \times 200$$

3.1.5. Dosage des lipides totaux plasmatiques

Nous avons utilisé des coffrets (Spinreact) pour réaliser ce dosage.

- Principe

Les lipides insaturés réagissent avec l'acide sulfurique pour former des ions carbonium, en suite ces ions réagissent avec le phosphovainille pour donner un couleur rose. L'intensité de couleur formé est proportionnelle à la concentration en lipides totaux dans l'échantillon (Kaplan *et al.*, 1984).

- Réactifs

Réactif	Phosphovainilline	235 mmol/L
Étalon	Lipides totaux	750 mg/dL
Réactif additionnel	Acide sulfurique	80 %

➤ **Réactif du travail** : le réactif et étalon sont prêts à l'emploi.

- Mode opératoire

	Blanc	Étalon	Echantillon
Réactif de travail (ml)	2.5	2.5	2.5
Étalon (µl)	--	100	--
Echantillon (µl)	--	--	100

Mélanger entièrement à l'aide d'un agitateur et incuber les tubes préparés pendant 10 min dans un bain marie à 100 °C.

Refroidir les tubes dans l'eau glacée.

Milieu réactionnel (µl)	--	50	50
Phosphovainilline (ml)	1	1	1

Mélanger entièrement à l'aide d'un agitateur et incuber pendant 15 min à 37 °C.

Lire les absorbances des échantillons et de l'étalon contre le blanc réactif à 520 nm.

La coloration finale est stable une heure.

- Calcul de la concentration

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

$$\text{Lipides totaux (mg/dL)} = \frac{\text{DO échantillon}}{\text{DO étalon}} \times \text{concentration de l'étalon (750 mg/dL)}$$

3.1.6. Dosage des transaminases plasmatiques

a - Dosage de l'aspartate aminotransférase (ASAT)

Nous avons utilisé des coffrets (Spinreact) pour réaliser ce dosage.

- Principe

L'aspartate aminotransférase (ASAT) appelée aussi l'oxaloacétate de glutamate transaminase (GOT) catalyse le transfert réversible d'un groupe aminé à partir de l'aspartate au α -cétoglutarate formant le glutamate et l'oxaloacétate. L'oxaloacétate est réduit au malate par la malate déshydrogénase (MDH) et le NADH,H⁺ (Murray, 1984) selon la réaction ci-dessous :



- Réactifs

Réactif R1 : Tampon	Tris pH 7.8	80 mmol/L
	L- Aspartate	200 mmol/L
Réactif R2 : Substrat	NADH	0.18 mmol/L
	Lactate déshydrogénase (LDH)	800 U/L
	Malate déshydrogénase (MDH)	600 U/L
	α -Cétoglutarate	12 mmol/L

- **Réactif de travail** : Dissoudre un comprimé de R2 dans un flacon de R1. Ce réactif est stable 21 jours à 2-8°C ou 72 heures à 15-25°C.

- Mode opératoire

Réactif de travail (ml)	1.0
Echantillon (μ l)	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.

- Calcul de la concentration

La concentration d'aspartate aminotransférase calculée par la formule suivante :

$$\text{ASAT (U/L)} = \Delta\text{DO}/\text{min} \times 1750$$

b - Dosage de l'alanine aminotransférase (ALAT)

Nous avons utilisé des coffrets (Spinreact) pour réaliser ce dosage.

- Principe

L'alanine aminotransférase (ALAT) appelée aussi le pyruvate de glutamate transaminase (TGP) catalyse le transfert réversible d'un groupe aminé à partir de l'alanine au α -cétoglutarate formant le glutamate et le pyruvate. Le pyruvate est réduit au lactate par la lactate déshydrogénase (MDH) et le NADH, H⁺ (Murray, 1984).

Ce 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 (Murray, 1984).

- Réactifs

Réactif R1 : Tampon	Tris pH 7.8	100 mmol/L
	L- Alanine	500 mmol/L
Réactif R2 : Substrat	NADH	0.18 mmol/L
	Lactate déshydrogénase (LDH)	1200 U/L
	α -Cétoglutarate	15 mmol/L

- **Réactif de travail** : Dissoudre le contenant du R2 dans le flacon de R1. Ce réactif est stable 2 semaines à 2-8°C.

- 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 (Δ Abs/min) pour l'utiliser dans les calculs.

- Calcul de la concentration

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

$$\text{ALAT (U/L)} = \Delta\text{DO}/\text{min} \times 1750$$

3.1.7. Dosage de la phosphatase alcaline (PAL) plasmatique

Pour réaliser ce dosage, nous avons utilisé des coffrets (Spinreact).

- Principe

La phosphatase alcaline catalyse l'hydrolyse de p-nitrophényl phosphate à pH 10.4 pour donner le p-nitrophénol et le phosphate (Wenger et al., 1984 ; Rosalki et al., 1993), 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.

- Réactifs

Réactif 1 : Tampon	Diéthanolamine (DEA) pH 10.4	1mmol/L
	Chlorure de magnésium	0.5mmol/L
Réactif 2 : Substrat	p-Nitrophénylphosphate (pNPP)	10mmol/L

- **Réactif de travail** : dissoudre une tablette de réactif 2 (substrat) dans une bouteille du réactif 1 (tampon).

- Mode opératoire

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

Mélanger, incuber pendant une minute. Lire à 405 nm l'absorbance initiale et démarrer le chronomètre simultanément. Lire à nouveau après 1, 2 et 3 minutes.

Déterminer la moyenne des absorbances par minutes (Δ abs/min) pour l'utiliser dans les calculs.

- Calcul de la concentration

Pour estimer l'activité enzymatique de la phosphatase alcaline, on utilise la formule suivante :

$$\text{Phosphatase alcaline (U/L)} = \Delta \text{ DO/min} \times 3300$$

3.1.8. Dosage de lactate déshydrogénase (LDH) plasmatique

Nous avons utilisé des coffrets (Spinreact) pour réaliser ce dosage.

- Principe

Lactate déshydrogénase catalyse la réduction du pyruvate par le NADH (Pesce, 1984), selon la réaction suivante :



Le taux de la diminution de la concentration de NADPH ; mesurer photométriquement, est proportionnel à la concentration catalytique de LDH présent dans l'échantillon.

- Réactifs

Réactif R1 : Tampon	Imidazole	65 mmol/L
	Pyruvate	0.6 mmol/L
Réactif R2 : Substrat	NADH	0.18 mmol/L

- **Réactif du travail** : Dissoudre un comprimé de R1 (tampon) dans un flacon de R2 (substrat).

- Mode opératoire

	37°C
Réactif de travail (ml)	3.0
Echantillon (µl)	50

Mélanger et laisser 1 minute. Lire l'absorbance à 340 nm avec trois répétitions chaque minute d'incubation pour déterminer la moyenne $\Delta DO/\text{min}$.

- Calcul de la concentration

L'activité de LDH est calculée par la formule suivante :

$$\text{L'activité de LDH (U/L)} = \Delta \text{DO}/\text{min} \times 4925$$

3.1.9. Dosage des protéines totales plasmatiques

Le dosage de protéine a été réalisé par la méthode colorimétrique (selon la fiche technique Spinreact).

- Principe

Les protéines forment un complexe coloré en bleu violet intensif avec les ions de cuivre dans un milieu alcalin. L'intensité de la couleur formée est proportionnelle à la concentration des protéines totales dans l'échantillon (Koller, 1984 ; Burtis et *al.*, 1999).

- Réactifs

Réactif (Biuret)	Tartrate de potassium sodium	15 mmol/L
	Iodure de sodium	100 mmol/L
	Iodure de potassium	5 mmol/L
	Sulfate de cuivre	19 mmol/L
Étalon	Sérum albumine bovin	7 g/dL

➤ *Réactif du travail* : le réactif est prêt à l'emploi.

- Mode opératoire

	Blanc	Étalon	Echantillon
Réactif de travail (ml)	1.0	1.0	1.0
Étalon (µl)	--	25	--
Echantillon (µl)	--	--	25

Mixer et incuber 5 min à 37 °C ou 10 min à la température ambiante (15-25°C).

Lire les absorbances des échantillons et de l'étalon contre le blanc réactif à 540 nm.

La coloration finale est stable au moins 30 minutes.

- Calcul de la concentration

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

$$\text{Protéines totales (g/dL)} = \frac{\text{DO échantillon}}{\text{DO étalon}} \times \text{concentration de l'étalon (7 g/dL)}$$

3.2. Exploration de la fonction rénale

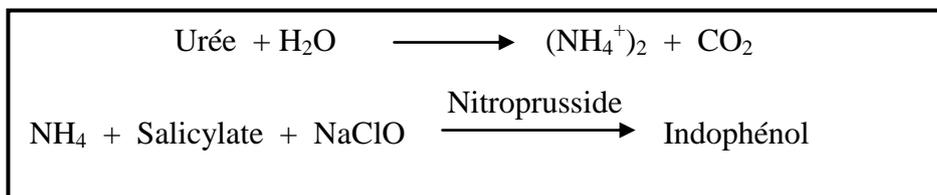
3.2.1. Dosage de l'urée plasmatique

Le dosage de l'urée a été réalisé par la méthode cinétique enzymatique à l'uréase (selon la fiche technique Spinreact).

- Principe

L'urée est hydrolysée enzymatiquement en ions d'ammoniac (NH_4^+) et dioxyde de carbone (CO_2).

Les ions d'ammoniac formés réagissent avec le salicylate et l'hypochlorite (NaClO) en présence du catalyseur nitroprusside pour former l'indophénol vert (Kaplan, 1984), selon les réactions suivantes :



L'intensité de la coloration formée est proportionnelle à la concentration de l'urée dans l'échantillon.

- Réactifs

Réactif 1 : Tampon	Phosphate pH 6.7	50 mmol/L
	EDTA	2 mmol/L
	Sodium salicylate	400 mmol/L
	Sodium nitroprusside	10 mmol/L
Réactif 2 : NaClO	Sodium hydrochlorite (NaClO)	140 mmol/L
	Sodium hydroxyde	150 mmol/L
Réactif 3 : Enzymes	Uréase	30000 U/L
Urée calibrant	Urée aqueux (Standard) 50 mg/dL	

- **Réactif du travail :** Dissoudre une tablette de réactif 3 (enzymes) dans une bouteille de réactif 1 (tampon) et mélanger légèrement. Le réactif 2 (NaClO) est préparé pour l'utiliser.

- Mode opératoire

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

Mixer et incuber 5 min à 37 °C ou 10 min à la température ambiante (15-25°C).

	Blanc	Etalon	Echantillon
Réactif 2 (ml)	1.0	1.0	1.0

Mixer et incuber 5 min à 37 °C ou 10 min à la température ambiante (15-25°C).

Lire les absorbances des échantillons et de l'étalon contre le blanc réactif à 340 nm.

La coloration finale est stable au moins 30 minutes.

- Calcul de la concentration

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

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

3.2.2. Dosage de la créatinine plasmatique

La détermination de la créatinine a été réalisée par la méthode cinétique colorimétrique (selon la fiche technique Spinreact).

- Principe

L'essai est basé sur la réaction de la créatinine avec le picrate sodium : 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 (Murray, 1984).

- Réactifs

Réactif 1	Acide picrique	17.5 mmol/L
Réactif 2	Hydroxyde de sodium	0.29mol/L
créatinine calibrant	Créatinine aqueux (standard) 2 mg/dL	

➤ **Réactif de travail** : mélanger un volume de réactif 1 avec un volume de réactif 2.

- Mode opératoire

	Blanc	Étalon	Echantillon
Réactif de travail (ml)	1.0	1.0	1.0
Étalon (µl)	--	100	--
Echantillon (µl)	--	--	100

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

- Calcul de la concentration

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

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

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

3.3. Exploration de la fonction thyroïdienne (Thyroxine libre (FT4) plasmatique)

La détermination de la thyroxine libre (FT4) a été réalisée par un test quantitatif VIDAS FT4 automatisé sur les instruments de la famille VIDAS appartenant au BIOMÉRIEUX.

- Principe

Le principe du dosage associe la méthode immunoenzymatique par compétition à une détection finale en fluorescence (Enzyme Linked Fluorescent Assay, ELFA).

- Réactifs

Tous les réactifs de la réaction immunologique, cartouche, cône, contrôle et calibrateur FT4N sont prêts à l'emploi.

- Mode opératoire

Toutes les étapes du test sont réalisées automatiquement par l'instrument.

L'échantillon est prélevé puis transféré dans le puits contenant un anticorps anti-T4 marqué à la phosphatase alcaline (conjugué). Il s'effectue une compétition entre l'antigène présent dans l'échantillon et l'antigène T4 fixé sur le cône vis-à-vis des sites de l'anticorps spécifique anti-T4 conjugué.

Lors de l'étape finale de révélation, le substrat (4-Méthyl-ombelliferyl phosphate) est aspiré puis refoulé dans le cône : l'enzyme du conjugué catalyse la réaction d'hydrolyse de ce substrat en un produit (4-Méthyl-ombelliféron) dont la fluorescence émise est mesurée à 450nm.

- Calcul de la concentration

La valeur du signal de fluorescence est inversement proportionnelle à la concentration de l'antigène présent dans l'échantillon. A la fin du test, les résultats sont calculés automatiquement par l'instrument par rapport à une courbe de calibration mémorisée.

3.4. Exploration du stress oxydant

4.4.1. Préparation de l'homogénat

a - Homogénat des organes

Un gramme de foie, rein ou du cerveau de rats des différents groupes étudiés, a été utilisé. Après broyage et homogénéisation des tissus dans la TBS (Tris 50 mM, NaCl 150

mM, pH 7.4), on a procédé à une centrifugation de la suspension cellulaire (9000 tours/min, 4°C, 15 min), puis le surnageant obtenu est aliquoté dans des tubes eppendorfs puis conservés à -20°C en attendant d'effectuer les dosages des paramètres du stress oxydant.

b - Homogénat des érythrocytes

Les culots contenant les érythrocytes ont été suspendus dans la TBS (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7.4) puis centrifugés (9000 tours/min, 4°C, 15 min). Ce processus a été répété deux fois et le surnageant final obtenu est aliquoté dans des tubes eppendorfs puis conservés à -20°C en attendant d'effectuer les dosages des paramètres du stress oxydant.

3.4.2. Détermination de la peroxydation lipidique (LPO) par le taux du malondialdéhyde (MDA) au niveau tissulaire

Le MDA est l'un des produits terminaux formés lors de la décomposition des acides gras polyinsaturés (PUFA) méditées par les radicaux libres.

Le niveau de peroxydation lipidique a été évalué en mesurant le malondialdéhyde avec le test TBARS (Thiobarbituric reactive species) selon la méthode de Buege et Aust (1972). Le test TBARS est le test le plus couramment utilisé pour déterminer indirectement la peroxydation des lipides, en mesurant le MDA.

- Principe

Le principe de ce dosage est basé sur la condensation de MDA en milieu acide et à chaud avec l'acide thiobarbiturique. La réaction entraîne la formation d'un complexe de couleur rose entre deux molécules d'acide thiobarbiturique qui peut être donc mesuré par spectrophotométrie d'absorption à 530 nm (Figure 17).

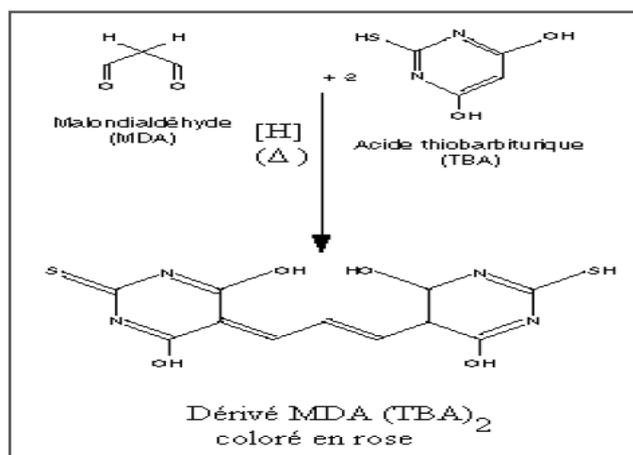


Fig.17 : Principe du dosage du malondialdéhyde.

- Mode opératoire

- ↪ Prélever 125 µl de l'homogénat (surnageant) ;
- ↪ Ajouter 50 µl de la solution tampon TBS ;
- ↪ Ajouter 125 µl de la solution TCA-BHT (TCA 20%, BHT 1%) ;
- ↪ Vortexer et Centrifuger à 1000 tours/min pendant 10 min à 4°C ;
- ↪ Prélever 200 µl du surnageant ;
- ↪ Ajouter 40 µl du HCl (0.6 M) ;
- ↪ Ajouter 160 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 min.

- Calcul de la concentration

On calcule la concentration de MDA exprimé en nanomoles par milligramme de protéines (nmol/mg prot) selon la formule suivante :

$$C = \frac{DO \cdot 10^6}{\varepsilon \cdot \chi \cdot L \cdot Fd}$$

- C : Concentration de MDA en nmoles/mg de prot ;
- DO : Densité optique lue à 530 nm ;
- ε : Coefficient d'extinction molaire du MDA, $\varepsilon_{MDA} = 1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$;
- L : Longueur du trajet optique = 0.779 cm ;
- χ : Concentration du surnagent en protéines (mg/ml) ;
- Fd : Facteur de dilution, Fd = 0.2083.

3.4.3. Détermination du taux de glutathion réduit (GSH) au niveau tissulaire

Le glutathion est un thiol intracellulaire le plus abondant présent dans toutes les cellules animales.

- Principe

Pour le dosage du glutathion, la méthode colorimétrique par le réactif d'Ellman (DTNB) est la méthode la plus employée (Ellman, 1959). La réaction consiste à couper la molécule d'acide 5,5' dithiodis-2-nitrobenzoïque (DTNB) par le GSH, ce qui libère l'acide thionitrobenzoïque (TNB) (figure 18) lequel présente une absorbance à 412nm.

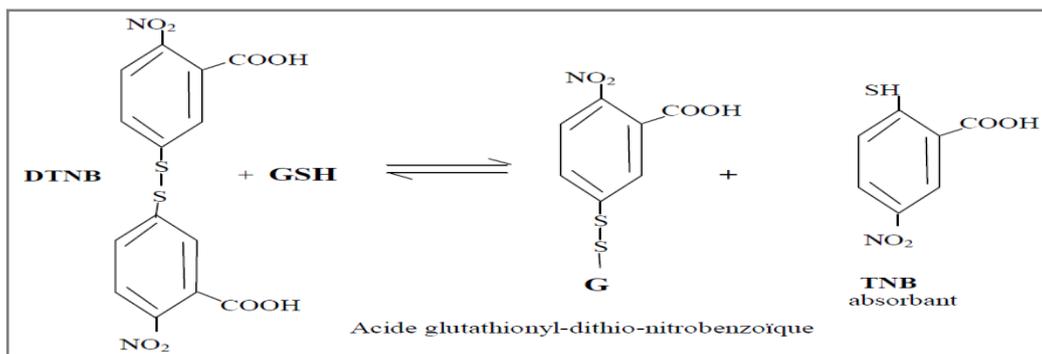


Fig.18 : Principe de dosage du glutathion.

- Mode opératoire

- ↪ Prélever 0.8 ml de l'homogénat ;
- ↪ Ajouter 0.2 ml de la solution d'acide sulfosalicylique (0.25%) et laisser pendant 15 min dans un bain de glace ;
- ↪ Centrifuger à 1000 tours/min pendant 15 min ;
- ↪ Prélever 0.5 ml du surnageant ;
- ↪ Ajouter 1ml du tampon Tris-EDTA (contenant 0,02M d'EDTA, pH 9.6) ;
- ↪ 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 412nm contre le blanc réactif.

- Calcul de la concentration

On calcule la concentration du GSH exprimée en nanomoles par milligramme de protéines (nmol/mg prot) selon la formule suivante :

$$\text{GSH} = \frac{\text{DO} \times \text{L} \times 1.525}{13100 \times 0.8 \times 0.5 \times \text{mg prot}}$$

- DO : Densité optique ;
- L : Volume total des solutions utilisées dans la déprotéinisation ;
- 1.525 : Volume total des solutions utilisées dans le dosage du GSH au niveau du surnageant ;
- 13100 : Coefficient d'absorbance du groupement -SH à 412 nm ;
- 0.8 : Volume de l'homogénat ;
- 0.5 : Volume du surnageant.

3.4.4. Détermination de l'activité de quelques enzymes antioxydantes au niveau tissulaire

a - Dosage de l'activité de la glutathion peroxydase (GPx)

Le terme glutathion peroxydase est réservé pour les sélénoprotéines catalysant la réaction :



- Principe

L'activité de la glutathion peroxydase (GPx) a été mesurée selon la méthode de Flohe et Gunzler (1984). Cette activité a été calculée par la diminution de taux de GSH réduit par rapport à la réaction non enzymatique « blanc ».

- Mode opératoire

- ↪ Prélever 0.3 ml de l'homogénat ;
- ↪ Ajouter 0.2 ml de GSH (2 mM) ;
- ↪ Ajouter 0.3 ml de la solution tampon PBS (0.1 M, pH 7.4) ;
- ↪ Ajouter 0.1 ml de la solution azoture de sodium (10 mM) ;
- ↪ Ajouter 0.1 ml de H₂O₂ (1 mM) pour initier la réaction ;
- ↪ Incuber à 37°C, pendant 15 min ;
- ↪ Ajouter 0.5 ml de TCA (5%) pour arrêter la réaction ;
- ↪ Centrifuger à 3000 tours/min durant 10 min ;
- ↪ Prélever 0.1 ml du surnageant ;
- ↪ Ajouter 0.2 ml de la solution tampon PBS (0.1 M, pH 7.4) ;
- ↪ Ajouter 0.7 ml de DTNB (0.4 mg/ml) ;
- ↪ Mélanger et après 5 minutes lire les densités optiques à 420 nm.

- Calcul de l'activité de la GPx

L'activité de la GPx exprimé en nanomoles de GSH oxydé par milligramme de protéines (nmol GSH/mg prot) selon la formule suivante :

$$\text{GPx (nmol GSH/mg prot)} = \frac{\text{X (nmol de GSH réduit)} \times 5}{\text{mg prot}}$$

$$\text{X} = \frac{\text{DO échantillon} - \text{DO étalon}}{\text{DO étalon}}$$

b - Dosage de l'activité de la glutathion S-transférase (GST)

Les glutathion S-transférases appartiennent à une famille d'enzyme multifonctionnelle essentiellement cytosolique, impliqués dans le transport et la biosynthèse intracellulaire, elles catalysent des réactions de conjugaison entre un peptide endogène, le glutathion, et des molécules réactives comportant des sites électrophiles.

- Principe

La technique que nous avons utilisée pour doser l'activité de GST est celle de Habig et *al.*, 1974, elle mesure la cinétique de formation entre un substrat modèle, le chlorodinitrobenzène (C-DNB) et le glutathion, qui absorbe la lumière à 340 nm.

- Mode opératoire

Réactifs	Blanc (µl)	Essai (µl)
Tampon phosphate (PBS) (0.1 M, pH 7.4)	850	830
CDNB (0.02 M)	50	50
GSH (0.1 M)	100	100
Homogénat	–	20

↳ La lecture de l'absorbance se fait à 340 nm après 30 s en intervalle de 3 min.

- Calcul de l'activité de la GST

L'activité de la GST exprimée en nanomoles de C-DNB par minute par milligramme de protéines (nmol C-DNB/min/mg prot) selon la formule suivante :

$$\text{GST (nmol C-DNB/min/mg prot)} = \frac{\Delta \text{ DO échantillon} - \Delta \text{ DO Blanc}}{\varepsilon \times L \times \text{mg prot}}$$

- $\Delta \text{ DO échantillon} - \Delta \text{ DO blanc}$: moyenne des DO des échantillons par minute – moyenne des DO des Blancs par minute ;
- ε : Coefficient d'extinction moléculaire du C-DNB, $\varepsilon_{\text{C-DNB}} = 9.6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$;
- L : Trajet optique de la cuve = 1cm.

c - Dosage de l'activité de la catalase (CAT)**- Principe**

Les catalases sont présentes dans un grand nombre de tissus. Ce sont des enzymes tétramériques, chaque unité portant une molécule d'hème et une molécule de NADPH. Ces enzymes interviennent dans la défense de la cellule contre le stress oxydant en éliminant les espèces réactives et en accélérant la réaction spontanée de l'hydrolyse du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) toxique pour la cellule en eau et en oxygène (Aebi, 1984).

La réaction se fait en deux étapes. La réaction bilan est :



L'activité de la CAT est mesurée à 240nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV/visible par la variation de la densité optique consécutive à la dismutation du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2).

- Mode opératoire

Réactifs	Blanc (μl)	Essai (μl)
Tampon phosphate (PBS) (0.1 M, pH 7.4)	800	780
H_2O_2 (0.5 M)	200	200
Homogénat	–	20

↪ Régler le zéro de l'appareil par la solution PBS ;

↪ La lecture de l'absorbance se fait à 340 nm après 15 s de délai et durent 60 s de mesure.

- Calcul de l'activité de la CAT

L'activité de la CAT exprimée en micromoles de H_2O_2 par minute par milligramme de protéines (μmol de $\text{H}_2\text{O}_2/\text{min}/\text{mg}$ prot) selon la formule suivante :

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

- ΔDO : variation de la densité optique par minutes, c'est-à-dire pour :
 - * AI (Absorbance initiale) : 15 s ;
 - * AF (Absorbance finale) : 1min ;
 - On fait : $(AI - AF) \times 4/3$ par min ;
- d : dilution de l'échantillon au début ;
- ϵ : Coefficient d'extinction moléculaire de l'eau oxygénée, $\epsilon_{H_2O_2} = 0.043 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} = 0,043 \text{ } \mu\text{mol cm}^{-1} \text{ml}^{-1}$;
- L : Trajet optique de la cuve = 1 cm ;
- X : Concentration de protéines en mg/ml.

3.4.5. Dosage des protéines totales au niveau tissulaire

- Principe

Les protéines tissulaires ont été quantifiées selon la méthode colorimétrique de Bradford (1976) qui utilise le Bleu Brillant de Coomassie G250 (BBC) comme réactif et l'albumine de sérum de bœuf (BSA) comme standard. Le BBC réagit avec les groupements amines ($-\text{NH}_2$) des protéines pour former un complexe de couleur bleue. L'apparition de cette couleur reflète le degré d'ionisation du milieu acide et l'intensité établit la concentration des protéines qui est mesurée spectrophotométriquement à 595nm.

- Mode opératoire

- ↳ Prélever 0.1 ml de l'homogénat ;
- ↳ Ajouter 5 ml de bleu brillant de Coomassie (BBC) (G250), comme réactif ;
- ↳ Agiter et laisser le mélange à température ambiante pendant 5 min pour la stabilisation de la couleur ;
- ↳ Mesurer l'absorbance de l'échantillon à 595nm contre le blanc contenant l'eau distillée à la place de l'homogénat. La densité optique obtenue est rapportée sur la courbe d'étalonnage ($0 \rightarrow 1 \text{ mg/ml}$ de BSA) préalablement réalisée dans les mêmes conditions (figure 19).

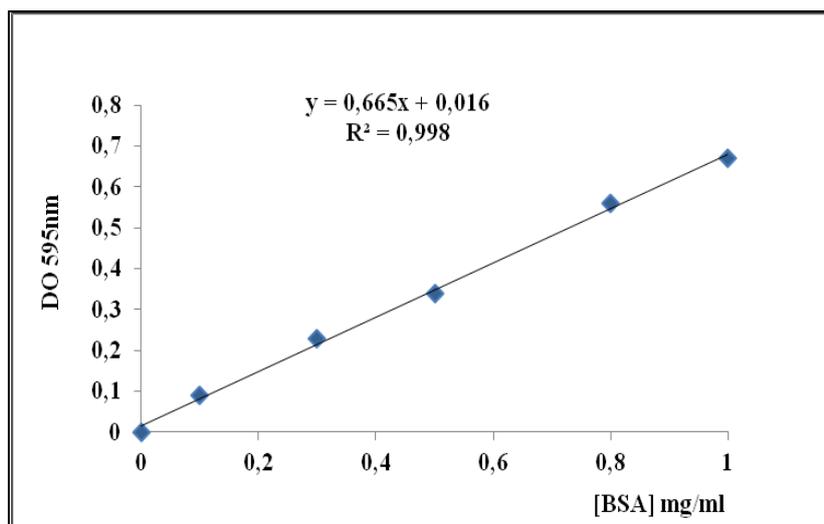


Fig. 19 : La courbe d'étalonnage utilisée (BSA 1mg/ml) pour le dosage des protéines.

3.5. Détermination de l'activité de l'acétylcholinestérase (AChE) et de lactate déshydrogénase (LDH)

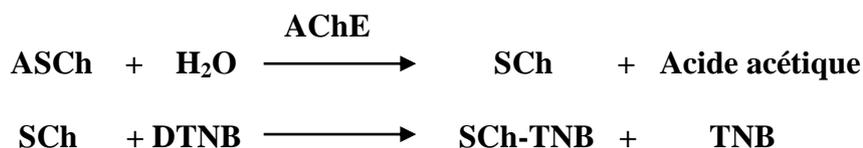
3.5.1. Dosage de l'activité de l'acétylcholinestérase (AChE)

- Principe

La méthode utilisée est celle décrite par Ellman et *al.*, (1961). C'est une méthode colorimétrique.

Ainsi l'acétylcholinestérase contenue dans la fraction des tissus va réagir avec l'acétylthiocholine (ASCh) en libérant l'acétate et la thiocholine (SCh). Cette dernière réagit à son tour avec le 5-5'-Dithio-bis (2-nitrobenzoate) (DTNB) en donnant du TNB produit de couleur jaune qui absorbe à 412 nm et dont la concentration est proportionnelle à la quantité d'enzymes présente dans le milieu.

La réaction peut se schématiser ainsi :



- Mode opératoire

Réactifs	Blanc (µl)	Essai (µl)
Tampon phosphate (PBS) (0.1 M, pH 7.4)	1050	1000
DTNB	50	50
ASCh	50	50
Homogénat	–	50

↪ Les tubes sont bouchés puis agiter ;

↪ La lecture de l'absorbance se fait à 412 nm à un intervalle de temps de 25 min (lecture de la DO chaque 3min) contre la solution blanc.

- Calcul de l'activité de l'AChE

L'activité de l'AChE exprimée en nanomoles par minute par milligramme de protéines (nmol/min/mg prot) selon la formule suivante :

$$\text{AChE (nmol/min/mg prot)} = \frac{\Delta \text{DO} / \Delta t \times 1691.18}{P}$$

- $\Delta \text{DO} / \Delta t$: variation de la densité optique par minute ;
- P : Concentration de protéines en mg/ml.

3.5.2. Dosage de lactate déshydrogénase (LDH)

Nous avons utilisé des coffrets (Spinreact) pour réaliser ce dosage, détaillé en dessus.

IV. TECHNIQUE HISTOLOGIQUE

Les coupes histologiques ont été réalisées suivant la technique classique de Houlot (1984) :

Des fragments de foie de chaque rat sont retirés du Bouin alcoolique (26ml Formol, 7ml Acide acétique, 45ml Acide picrique 1% dans l'éthanol à 95% et 22ml Eau distillée) et sont coupés à l'aide de couteaux tranchant à fin de réaliser des prélèvements pour l'étude histologique avec une surface de 1 à 2cm² et une épaisseur de 1.5mm.

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

Déshydratation

Les échantillons sont ensuite déshydratés pendant 12 heures au minimum pour éliminer l'eau des tissus et cette opération nécessite le passage du tissu dans des bains d'éthanol de concentration croissante (70%, 80%, 90% et 100%). La déshydratation peut être accélérée par l'agitation rapide grâce à des automates spéciaux.

Inclusion

Les tissus sont alors plongés dans des bains de paraffine liquide (sous l'effet de la chaleur). Les tissus étant maintenus 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.

Coupes et coloration

Les blocs d'inclusions sont collés sur un porte-échantillon, la surface à coller est ramollie au moyen d'une lame métallique chauffée modérément à la flamme, puis posée sur le porte-objet sur lequel le bloc adhère très bien après une légère pression. Les coupes sérieuses sont réalisées à l'aide d'un microtome (l'épaisseur est de 4 à 7 microns). Ces coupes sont étalées et fixées sur la lame par l'utilisation d'une eau gélative chauffée.

Pour la coloration, on a utilisé la technique à l'Hématoxyline-Eosine (ou Hématoéine-Eosine) qui nécessite la présence de l'alcool acide (100ml d'alcool éthylique à 70% + 50ml d'acide HCl), eau ammoniacale (100ml d'eau distillée + 2ml d'ammoniaque) et solution d'Eosine (100ml Eosine solution aqueuse à 3%, 125ml alcool éthylique à 95%, 375ml eau distillée et 2 gouttes d'acide acétiques) selon 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 violacé les structures basophiles (noyaux) ;
- ☞ Différencier les coupes dans l'alcool acide (1 à 2 plongées), déposer ensuite les lames dans un bain du robinet et vérifier la différenciation au microscope ;

- ☞ Bleuir dans un bain d'eau d'ammoniacale ;
- ☞ Immerger dans un bain d'Eosine (15 secondes à 2 minutes) qui colore les structures acidophiles (cytoplasme) ;
- ☞ Enfin déshydrater, éclaircir et monter les lames à Eukitt. Tous ces bains sont séparés par des lavages à l'eau du robinet.

V. PRESENTATION DES RESULTATS ET ANALYSES STATISTIQUES

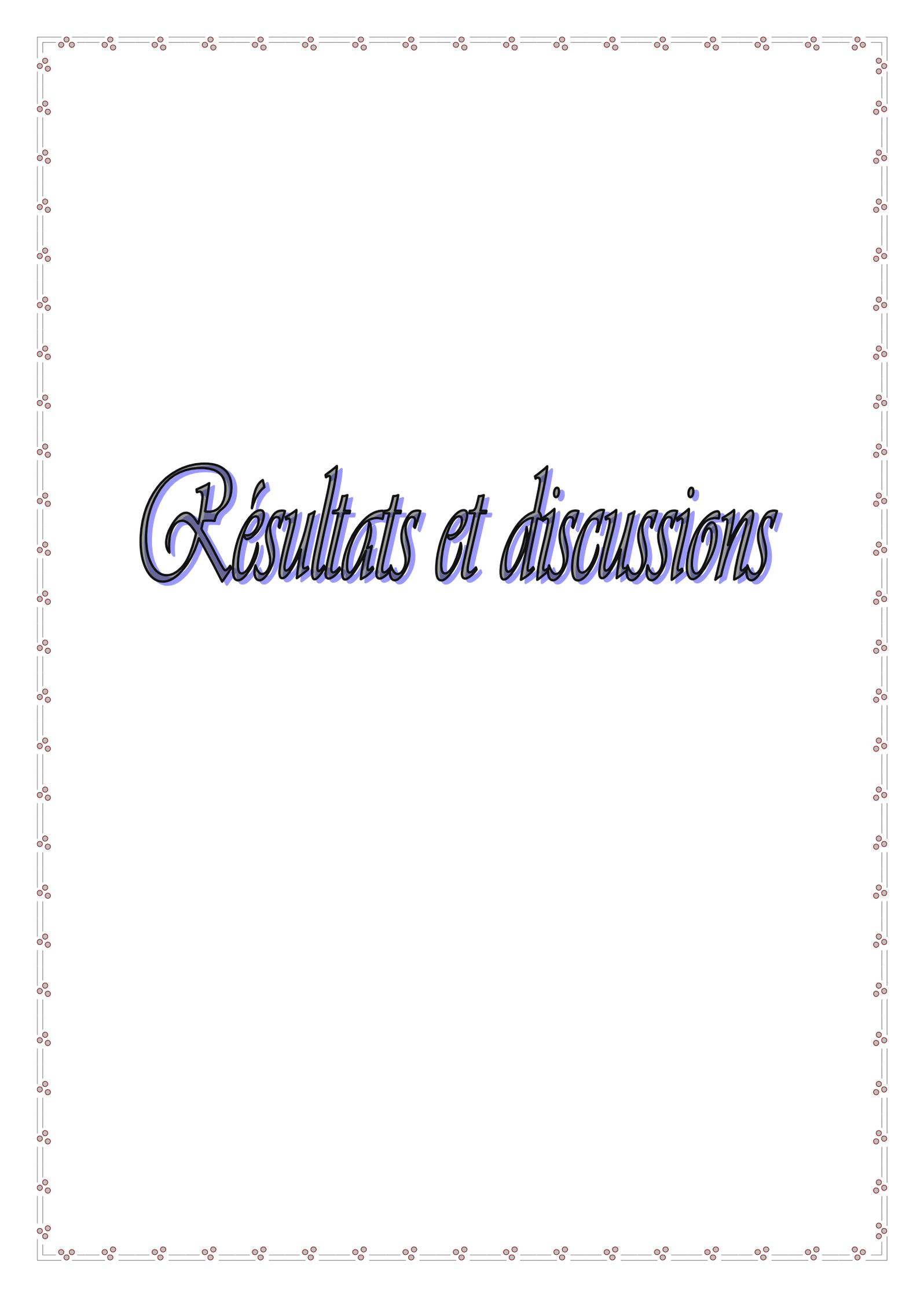
Les résultats ont été représentés sous forme de moyennes avec leur écart-type (Moy ± écart-type).

Les analyses statistiques ont été effectuées pour une probabilité définie selon le test de la variable « t » de Student (grâce à l'Excel).

Nous avons effectués trois comparaisons :

- Les groupes traités (MET, MET/Se, MET/Vit C et MET/Se+Vit C) par rapport au groupe témoin :
 - ✓ * : Différence significative ($p \leq 0.05$) ;
 - ✓ ** : Différence hautement significative ($p \leq 0.01$) ;
 - ✓ *** : Différence très hautement significative ($p \leq 0.001$).
- Les groupes traités (MET/Se, MET/Vit C et MET/Se+Vit C) par rapport au groupe traité (MET) :
 - ✓ # : Différence significative ($p \leq 0.05$) ;
 - ✓ ## : Différence hautement significative ($p \leq 0.01$) ;
 - ✓ ### : Différence très hautement significative ($p \leq 0.001$).
- Les groupes traités (MET/Se et MET/Vit C) par rapport au groupe traité (MET/Se+Vit C) :
 - ✓ + : Différence significative ($p \leq 0.05$) ;
 - ✓ ++ : Différence hautement significative ($p \leq 0.01$) ;
 - ✓ +++ : Différence très hautement significative ($p \leq 0.001$).

- Avec p : Seuil de signification.



Résultats et discussions

RESULTATS ET DISCUSSIONS

Chapitre I : Impact du méthomyl sur quelques paramètres physiologiques : Effets protecteurs de la supplémentation en sélénium et/ou en vitamine C

1. Action sur la croissance corporelle

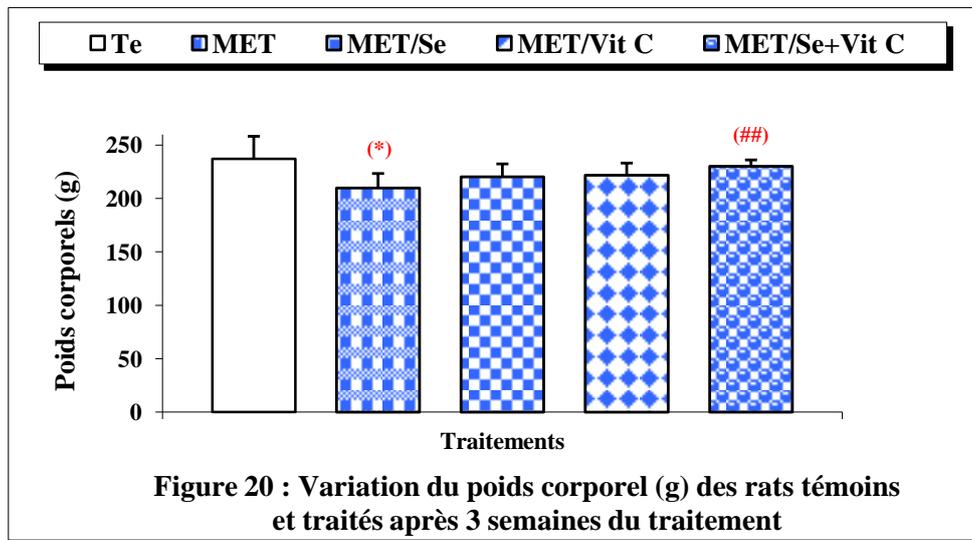
Nos résultats montrent une diminution significative du poids corporel et une baisse du gain de poids corporel chez le lot traité par le méthomyl comparativement au lot témoin. Tandis qu'on enregistre une nette amélioration du poids corporel par l'administration du sélénium plus la vitamine C au groupe traité par le méthomyl comparant au groupe traité par le Méthomyl (tableau 5 ; figure 20).

Tab.5 : Variation de poids corporel (PC) (g) chez les rats témoins et traités après 3 semaines du traitement.

Paramètres	Lots expérimentaux				
	Témoin	MET	MET/Se	MET/Vit C	MET/Se+Vit C
Poids initial (g)	208.87±19.15	208±27.65	208.62±19.7	210.12±14.85	207.87±20.4
Poids final (g)	237.21±21.16	210±13.54 ^(*)	220.3±12.24	222±11.32	230.21±6.05 ^(##)
%	–	-11.47%	- 7.13%	- 6.41%	- 2.95%
Gain de poids (g)	+ 28.34	+ 2	+ 11.68	+ 11.88	+ 22.34

* p ≤0.05 comparant aux témoins ;

p ≤0.01 comparant aux traités par MET.



* $p \leq 0.05$ comparant aux témoins ;

$p \leq 0.01$ comparant aux traités par MET.

2. Variation de la consommation quotidienne d'aliment et de l'eau de boisson

Les résultats obtenus pour le suivi de la consommation quotidienne d'aliment et de l'eau de boisson chez les rats témoins et les rats recevant le méthomyl ou la combinaison méthomyl plus sélénium et/ou vitamine C pendant les 3 semaines du traitement sont représentés dans le tableau 6.

Tab.6 : Consommation quotidienne de l'aliment et de l'eau de boisson chez les rats témoins et traités après 3 semaines du traitement.

Paramètres	Lots expérimentaux				
	Témoin	MET	MET/Se	MET/Vit C	MET/Se+Vit C
Consommation d'aliment (g/jour/rat)	20.48±1.2	15.7 ± 1.5(*)	17±1.6(*)	22.2 ± 1.5(*)	19.3 ± 1.7
Consommation d'eau de boisson (ml/jour/rat)	38 ± 6.6	19.6 ± 3(*)	21 ± 1.1(*)	21 ± 1.3(*)	21.12 ± 1
Quantités du MET ingérées (mg/jour/rat)	–	1.635 ± 0.15	1.526 ± 0.1(##)	1.524 ± 0.3(##)	1.515 ± 0.18

* $p \leq 0.05$ comparant aux témoins ;

$p \leq 0.05$ comparant aux traités par MET.

3. Action sur les poids absolu et relatif de certains organes

Nous avons suivi l'évolution des poids absolus (PA) et relatifs (PR) des organes suivants : le foie et les reins chez les rats témoins et les rats traités par le méthomyl ou la combinaison méthomyl plus sélénium et/ou vitamine C.

Les résultats obtenus montrent qu'il y a eu une augmentation significative du poids absolu du foie et du poids relatif du foie et des reins chez le groupe traité par le méthomyl comparant au groupe témoin. On note aussi une variation statistiquement significative des poids absolu et relatif des reins chez les rats recevant la combinaison méthomyl plus sélénium et vitamine C comparant aux rats témoins.

Par contre, on enregistre un rétablissement par une diminution significative des poids absolus et relatifs de foie et des reins chez les rats traités par les combinaisons méthomyl plus sélénium et/ou vitamine C par rapport aux rats traités par le méthomyl.

L'administration de la vitamine C chez le lot traité par le méthomyl montre une variation statistiquement significative du poids relatif des reins comparant au lot traité par la combinaison méthomyl plus sélénium et vitamine C (tableau 7 ; figures 21 et 22).

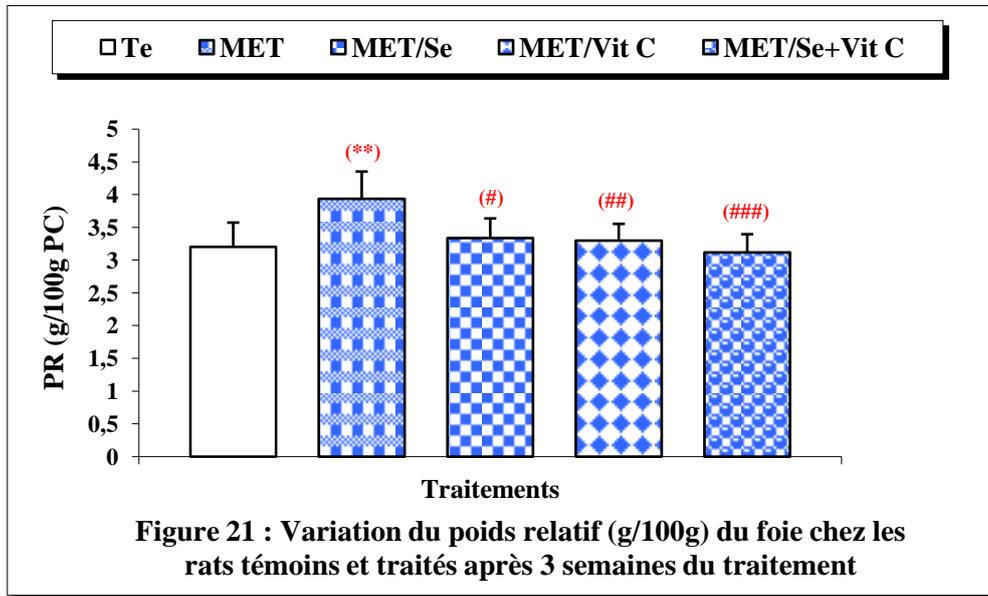
Tab. 7 : Variation de poids absolu (PA) (g) et relatif (PR) (g/100g de PC) du foie et des reins chez les rats témoins et traités après 3 semaines du traitement.

Paramètres	Lots expérimentaux				
	Témoin	MET	MET/Se	MET/Vit C	MET/Se+Vit C
PA du foie	7.52 ± 0.27	8.23 ± 0.68 ^(*)	7.33 ± 0.45 ^(#)	7.03 ± 0.41 ^(#)	7.17 ± 0.61 ^(##)
%	–	+ 9.44%	- 2.53%	- 6.52%	- 4.65%
PR du foie	3.199 ± 0.37	3.936 ± 0.42 ^(**)	3.34 ± 0.3 ^(#)	3.3 ± 0.25 ^(##)	3.12 ± 0.31 ^(###)
%	–	+ 23.04%	+ 4.41%	+ 3.16%	- 2.47%
PA des reins	1.34 ± 0.15	1.49 ± 0.14	1.13 ± 0.18 ^(###)	1.24 ± 0.13 ^(#)	1.10 ± 0.18 ^(***)
%	–	+ 11.19%	- 15.67%	- 7.46%	-17.91%
PR des reins	0.567 ± 0.03	0.715 ± 0.1 ^(*)	0.516 ± 0.06 ^(##)	0.562 ± 0.04 ^(#+)	0.481 ± 0.07 ^(***###)
%	–	+ 26.10%	- 8.99%	- 0.88%	- 15.17%

* p ≤ 0.05 ; ** p ≤ 0.01 comparant aux témoins ;

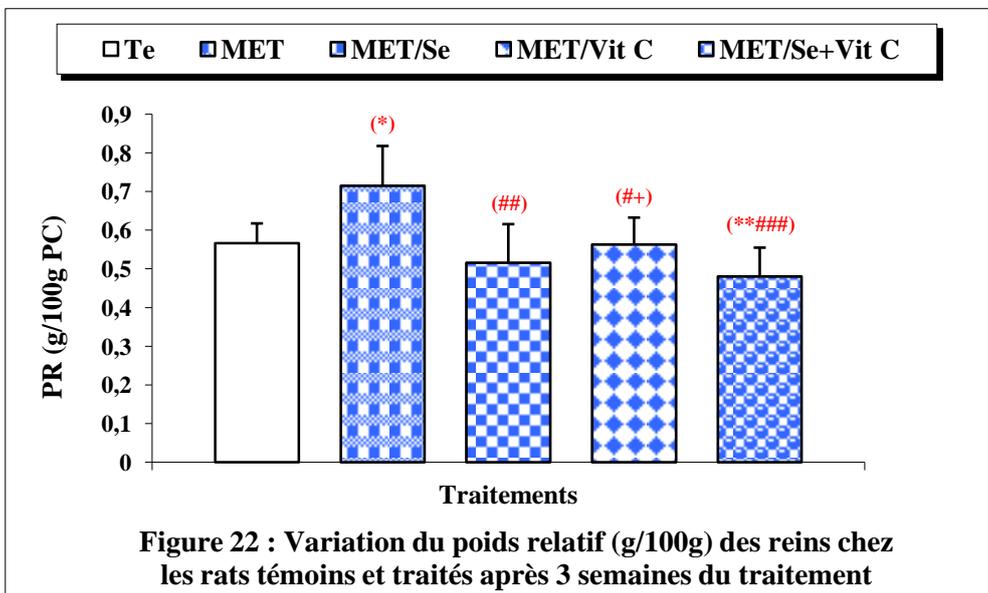
p ≤ 0.05 ; ## p ≤ 0.01 ; ### p ≤ 0.001 comparant aux traités par MET ;

+ p ≤ 0.05 traités par MET/Se ou Vit C comparant aux traités par MET/Se+Vit C.



** p ≤ 0.01 comparant aux témoins ;

p ≤ 0.05 ; ## p ≤ 0.01 ; ### p ≤ 0.001 comparant aux traités par MET.



* p ≤ 0.05 ; ** p ≤ 0.01 comparant aux témoins ;

p ≤ 0.05 ; ## p ≤ 0.01 ; ### p ≤ 0.001 comparant aux traités par MET ;

+ p ≤ 0.05 traités par MET/Se ou Vit C comparant aux traités par MET/Se+Vit C.

❖ Discussion

Les pesticides sont des produits chimiques largement utilisés dans l'agriculture pour augmenter la production et le rendement de nourriture et dans la santé publique pour contrôler les vecteurs des maladies. La diffusion de ces composés dans l'environnement par contamination de l'air, le sol, l'eau et les produits alimentaires provoquent l'exposition continue de la faune et des humains (Hernandez et *al.*, 2013). Les insecticides carbamates et organophosphates sont parmi les pesticides les plus généralement utilisés et qui ont remplacé la famille des organochlorés, insecticides très persistants.

En raison de l'utilisation répandue des carbamates, beaucoup d'incidences de leur empoisonnement accidentel ou professionnel ont été rapportées dans le monde entier chez l'homme et les animaux. L'exposition environnementale aux carbamates dans la population générale est principalement due à l'ingestion de la nourriture et de l'eau contaminés ou suite à leur inhalation (Kumari et *al.*, 2002).

De nombreuses recherches expérimentales et épidémiologiques, menées au cours des dernières décennies, ont mis en évidence les effets bénéfiques des antioxydants sur la santé humaine et animale (Agrawal et Sharma, 2010).

Le méthomyl, *N*-méthyle carbamate insecticide, que nous avons choisi pour notre étude est l'un des polluants et ces résidus les plus répandus dans l'eau, due à leur large application contre divers parasites. En effet, l'évaluation de leurs risques toxicologiques potentiels sur la santé humaine est considérée une source de souci principal et doit prise une très grande importance.

Dans le cadre de ce travail, nous nous sommes intéressés à étudier l'impact de ce polluant toxique (le méthomyl) sur la variation de certains paramètres physiologiques de l'organisme ainsi que l'effet protecteur de la supplémentation en sélénium et/ou en vitamine C chez des rats recevant cet insecticide dans l'eau de boisson.

Le méthomyl utilisé est une poudre de formulation commerciale appelée « Lannate® » contenant 25% de substance active obtenu d'Alpyte Spa « Algérienne des phytosanitaires » à raison de 8mg par kg de poids corporel et deux antioxydants, le sélénite de sodium à raison de 0.6mg par 100g de poids corporel et la vitamine C à raison de 200mg par kg de poids corporel en se basant sur les études précédentes, respectivement (Fayez et Bahig, 1991 ; Chattopadhyay et *al.*, 2003 ; Fetoui et *al.*, 2010).

La réduction de poids corporel est utilisée comme indicateur de la détérioration de l'état de santé générale du rat.

En effet, l'administration du méthomyl chez les rats a provoqué une diminution du poids corporel. Ceci pourrait être expliqué par la diminution des prises quotidiennes en aliment. En effet, dans notre étude expérimentale, le méthomyl a induit une diminution de la consommation quotidienne en aliment et en eau de boisson par les rats. Ces résultats permettent de suggérer que cet insecticide présente des effets néfastes sur la croissance corporelle des rats.

Nos résultats confirment d'autres travaux qui ont démontré que la croissance est affectée par un traitement des rats adultes par 1/10 de DL₅₀ de thiodicarbe, composé qui résulte de l'association de deux molécules de méthomyl (Al-Shinnawy, 2008) et par des doses de 2 à 5 mg/kg de poids corporel de carbofuran, un insecticide carbamate (Gbadegesin et al., 2014). Des études antérieures réalisées sur des rats adultes traités par des insecticides ont montré également une diminution significative de leurs poids corporels (El-Demerdash et al., 2004 ; Saoudi et al., 2011 ; Mossa et al., 2014).

Dans nos conditions expérimentales, l'addition de sélénium et/ou vitamine C aux rats traités par le méthomyl a engendré une élévation de poids corporel. Ceci pourrait être dû à la réduction de l'accumulation des radicaux libres induite par les antioxydants et confirmée par l'augmentation de la consommation quotidienne de nourriture. Ces résultats sont en accord avec les résultats obtenus par Al-Shinnawy (2008a), Ismail et al. (2009), Sankar et al. (2010), Messarah et al. (2012) et Mossa et al. (2014).

L'exposition professionnelle au méthomyl peut provoquer des effets néfastes sur la santé et sur différents organes ou tissus, incluant le tractus respiratoire, les tissus hématopoïétiques, le myocarde, le rein et le foie (Tsatsakis et al., 2001).

Concernant le poids des organes, nous remarquons une augmentation de poids absolu et relatif de foie et des reins chez les rats traités par le méthomyl à 8 mg/kg P.C. via l'eau de boisson. Ceci est explicable par l'hypertrophie tissulaire de ces organes causée par cet insecticide d'une part, et par l'accumulation de méthomyl dans ces organes cibles de détoxification d'autre part. Simons et al. (1995) ont signalé que l'augmentation des poids absolus ou relatifs des organes des animaux représente un indicateur de la cytotoxicité par les insecticides.

En revanche, l'administration de sélénium et/ou la vitamine C au groupe traité par le méthomyl a entraîné une amélioration des poids absolu et relatif des organes (foie et reins). Cette amélioration est due à l'effet protecteur du sélénium et de vitamine C contre la toxicité de méthomyl.

Chapitre II : Hépatotoxicité induite par le méthomyl : Effets protecteurs de la supplémentation en sélénium et/ou en vitamine C

1. Action sur certains biomarqueurs plasmatiques de la fonction hépatique

Le tableau 8 résume certains biomarqueurs plasmatiques de la fonction hépatique des rats témoins et des rats traités par le méthomyl et par les combinaisons méthomyl plus sélénium et/ou vitamine C après 3 semaines du traitement.

Tab.8 : Variation de quelques biomarqueurs plasmatiques de la fonction hépatique chez les rats témoins et traités après 3 semaines du traitement.

Paramètres	Lots expérimentaux				
	Témoin	MET	MET/Se	MET/Vit C	MET/Se+Vit C
Glucose (g/l)	0.814 ± 0.09	1.002 ± 0.05 ^(*)	0.748 ± 0.09 ^(##)	0.786 ± 0.08 ^(##)	0.740 ± 0.05 ^(##)
%	–	+ 23.09%	- 8.11%	- 3.44%	- 9.09%
bilirubine directe (g/l)	0.696±0.08	0.806±0.07 ^(*)	0.770±0.09 ⁽⁺⁺⁾	0.558±0.04 ^(###)	0.542±0.05 ^(###)
%	–	+ 15.80%	+ 10.63%	- 19.83%	- 22.13%
Cholestérol (g/l)	1.515±0.03	1.772±0.01 ^(*)	1.552±0.01 ^(#)	1.552±0.01 ^(#)	1.542±0.01 ^(#)
%	–	+ 16.96%	+ 2.44%	+ 2.44%	+ 1.78%
Triglycérides (g/l)	0.874±0.03	1.142±0.1 ^(**)	0.878±0.07 ^(##)	0.936±0.05 ^(##)	0.736±0.1 ^(###)
%	–	+ 30.66%	+ 0.46%	+ 7.09%	- 15.79%
Protéines totales (g/dl)	8.06±0.69	7.02±0.73 ^(*)	7.21±0.67	7.62±1.43	7.61±0.74
%	–	- 12.90%	- 10.55%	- 5.46%	- 5.58%
Lipides totaux (mg/dl)	209.40±69.05	394.81±67.23 ^(**)	358.92±60.81 ^(**++)	304.98±53.49 ⁽⁺⁺⁾	151.53±32.36 ^(##)
%	–	+ 88.54%	+ 71.40%	+ 45.65%	- 27.64%
ASAT (U/L)	21.8±0.84	24.6±0.89 ^(**)	21±1.22 ^(##)	19.4±0.96 ^(**###)	19.6±1.14 ^(**###)
%	–	+ 12.84%	- 3.67%	- 11.01%	- 10.09%
ALAT (U/L)	79.6±1.67	88.8±1.92 ^(**)	84±0.71 ^(**#)	69.8±1.92 ^(**###+++)	86±2.34 ^(**#)
%	–	+ 11.56%	+ 5.53%	- 12.31%	+ 8.04%
PAL (U/L)	20.56±0.29	23.54±1.33 ^(*)	19.73±1.22 ^(##)	16.15±1.99 ^(**##)	17.34±1.96 ^(**#)
%	–	+ 14.49%	- 4.04%	- 21.45%	- 15.66%
LDH (U/L)	931.07±32	972.84±4.2 ^(*)	962.8±6.28 ^(##)	816±87.02 ^(#)	832±80.74 ^(#)
%	–	+ 4.49%	+ 3.41%	- 12.36%	- 10.64%

* p ≤ 0.05 ; ** p ≤ 0.01 ; *** p ≤ 0.001 comparant aux témoins ;

p ≤ 0.05 ; ## p ≤ 0.01 ; ### p ≤ 0.001 comparant aux traités par MET ;

+ p ≤ 0.05 ; ++ p ≤ 0.01 ; +++ p ≤ 0.001 traités par MET/Se ou Vit C comparant aux traités par MET/Se+Vit C.

1.1. Concentration plasmatique en glucose

D'après les résultats obtenus (tableau 8 ; figure 23), on observe une augmentation significative de la concentration plasmatique en glucose chez le groupe traité par le méthomyl comparant au groupe témoin, par contre on enregistre un rétablissement par une diminution significative de la concentration plasmatique en glucose chez les lots traités par les combinaisons méthomyl plus sélénium et/ou vitamine C comparant au lot traité uniquement par le méthomyl.

1.2. Concentration plasmatique en bilirubine directe

L'administration du méthomyl chez les rats induit une augmentation significative de la concentration plasmatique en bilirubine directe. On note aussi une variation significative chez les rats traités par les combinaisons méthomyl plus vitamine C et méthomyl plus sélénium et vitamine C comparant aux rats témoins.

En revanche, nos résultats montrent un rétablissement par une diminution significative chez les lots traités par les combinaisons méthomyl plus vitamine C et méthomyl plus sélénium et vitamine C par rapport au lot traité par le méthomyl.

On note aussi une variation statistiquement significative chez les rats traités par la combinaison méthomyl plus sélénium comparant aux rats traités par la combinaison méthomyl plus sélénium et vitamine C (tableau 8 ; figure 24).

1.3. Concentration plasmatique en cholestérol et triglycérides

Les résultats obtenus montrent une augmentation significative des taux plasmatiques en cholestérol et triglycérides chez le groupe traité par le méthomyl comparant aux rats témoins, tandis qu'on enregistre une variation significative des triglycérides chez les rats traités par la combinaison méthomyl plus sélénium et vitamine C par rapport au lot témoin.

Par contre, on remarque un rétablissement par une diminution significative du cholestérol et des triglycérides chez les rats traités par les combinaisons méthomyl plus sélénium et/ou vitamine C par rapport aux rats traités par le méthomyl.

On note aussi une variation statistiquement significative des triglycérides chez les rats traités par la combinaison méthomyl plus sélénium ou vitamine C comparant aux rats traités par la combinaison méthomyl plus sélénium et vitamine C (tableau 8 ; figures 25 et 26).

1.4. Concentration plasmatique en protéines totales et lipides totaux

Nos résultats montrent que l'administration du méthomyl chez les rats provoque une diminution significative de la teneur plasmatique en protéines totales et une augmentation significative de la teneur plasmatique en lipides totaux comparant aux rats témoins.

On note également une variation statistiquement significative en lipides totaux chez le lot traité par la combinaison méthomyl plus sélénium comparant au lot témoin.

Par contre, on enregistre un rétablissement par une diminution statistiquement significative des lipides totaux chez les rats recevant la combinaison méthomyl plus sélénium et vitamine C comparant aux rats recevant par le méthomyl.

Chez les rats traités par la combinaison méthomyl plus sélénium ou vitamine C, on note une variation significative en lipides totaux comparant aux rats traités par la combinaison méthomyl plus sélénium et vitamine C (tableau 8 ; figures 27 et 28).

1.5. Activité des transaminases

Le traitement des rats par le méthomyl induit une augmentation significative de l'activité enzymatique des transaminases, l'aspartate aminotransférase (ASAT) et l'alanine aminotransférase (ALAT). On note une variation significative de l'activité de l'ASAT chez les groupes traités par les combinaisons méthomyl plus vitamine C et méthomyl plus sélénium et vitamine C et l'activité de l'ALAT chez les groupes traités par les combinaisons méthomyl plus sélénium et/ou vitamine C comparant au groupe témoin.

Par contre, on enregistre un rétablissement par une diminution significative de l'activité de l'ASAT et l'ALAT chez les lots traités par les combinaisons méthomyl plus sélénium et/ou vitamine C par rapport au lot traité par le méthomyl.

Chez les rats traités par la combinaison méthomyl plus vitamine C, on note une différence significative de l'activité de l'ALAT comparant aux rats traités par la combinaison méthomyl plus sélénium et vitamine C (tableau 8 ; figures 29 et 30).

1.6. Activité de la phosphatase alcaline (PAL)

Nos résultats montrent une augmentation significative de l'activité enzymatique de la phosphatase alcaline (PAL) chez les rats recevant le méthomyl par rapport aux rats témoins. On note une variation significative de l'activité de PAL chez les lots traités par les combinaisons méthomyl plus vitamine C et méthomyl plus sélénium et vitamine C comparant au lot témoin.

Tandis qu'on enregistre un rétablissement par une diminution significative de l'activité de PAL chez les groupes traités par les combinaisons méthomyl plus sélénium et/ou vitamine C par rapport au groupe traité par le méthomyl.

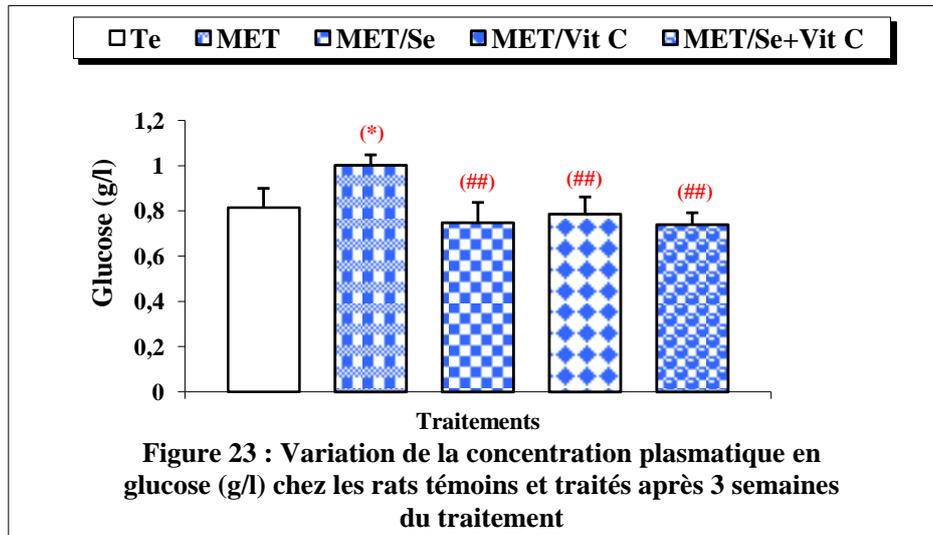
Chez les rats traités par la combinaison méthomyl plus sélénium, on note une différence significative comparant aux rats traités par la combinaison méthomyl plus sélénium et vitamine C (tableau 8 ; figure 31).

1.7. Activité de lactate déshydrogénase (LDH)

L'administration du méthomyl aux rats provoque une augmentation significative de l'activité de lactate déshydrogénase (LDH) par rapport aux rats témoins.

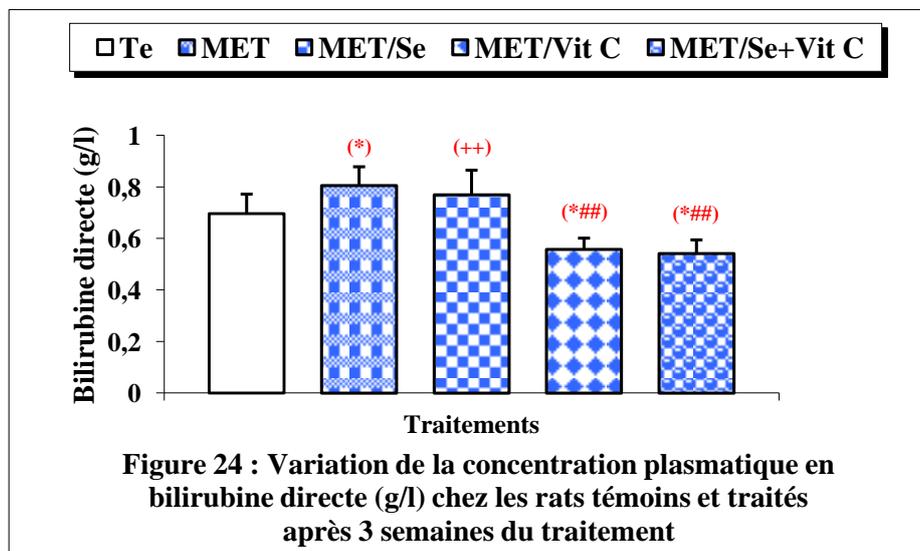
Par contre, on enregistre un rétablissement par une diminution significative de l'activité de LDH chez les lots recevant les combinaisons méthomyl plus sélénium et/ou vitamine C par rapport au lot recevant le méthomyl.

Chez les rats traités par la combinaison méthomyl plus sélénium, on note une différence significative comparant aux rats traités par la combinaison méthomyl plus sélénium et vitamine C (tableau 8 ; figure 32).



* $p \leq 0.05$ comparant aux témoins ;

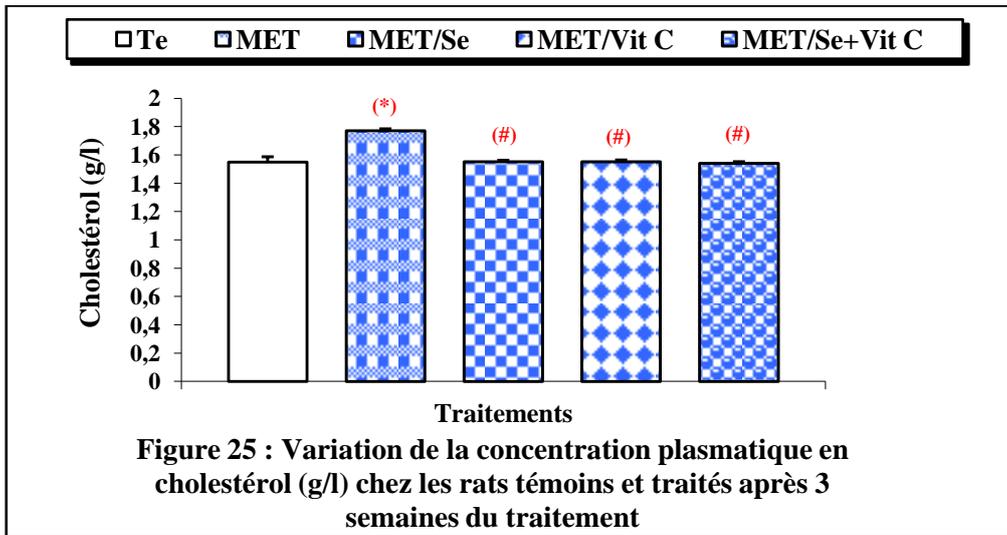
$p \leq 0.01$ comparant aux traités par MET.



* $p \leq 0.05$ comparant aux témoins ;

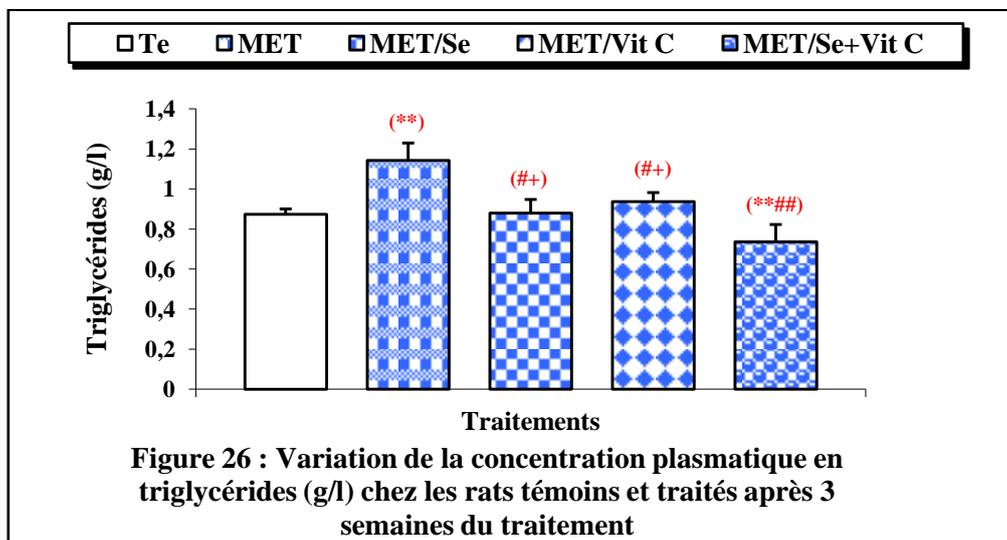
$p \leq 0.01$ comparant aux traités par MET ;

++ $p \leq 0.01$ traités par MET/Se ou Vit C comparant aux traités par MET/Se+Vit C.



* $p \leq 0.05$ comparant aux témoins ;

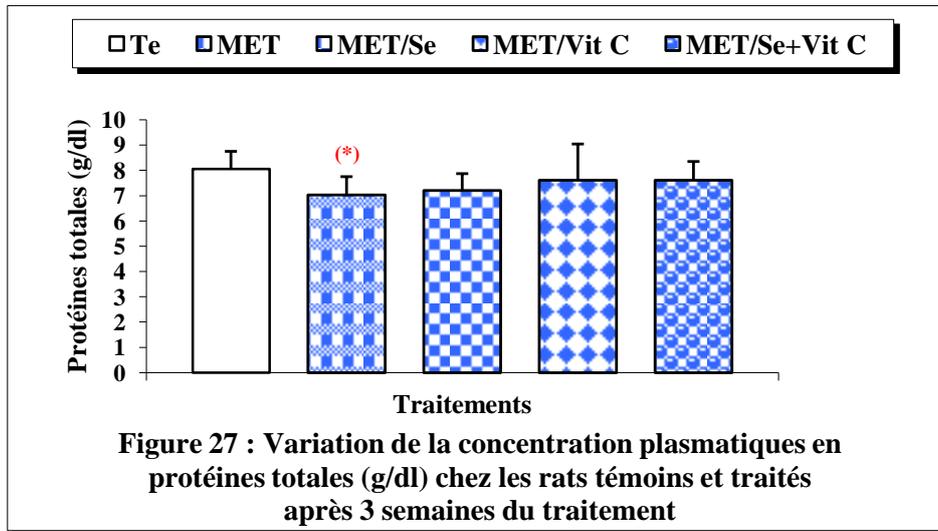
$p \leq 0.05$ comparant aux traités par MET.



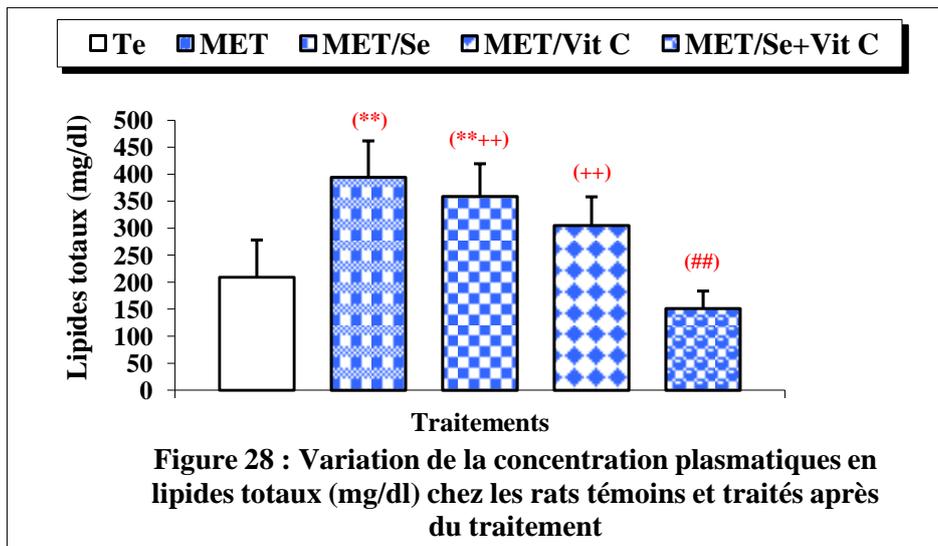
** $p \leq 0.01$ comparant aux témoins ;

$p \leq 0.05$; ## $p \leq 0.01$ comparant aux traités par MET ;

+ $p \leq 0.05$ traités par MET/Se ou Vit C comparant aux traités par MET/Se+Vit C.



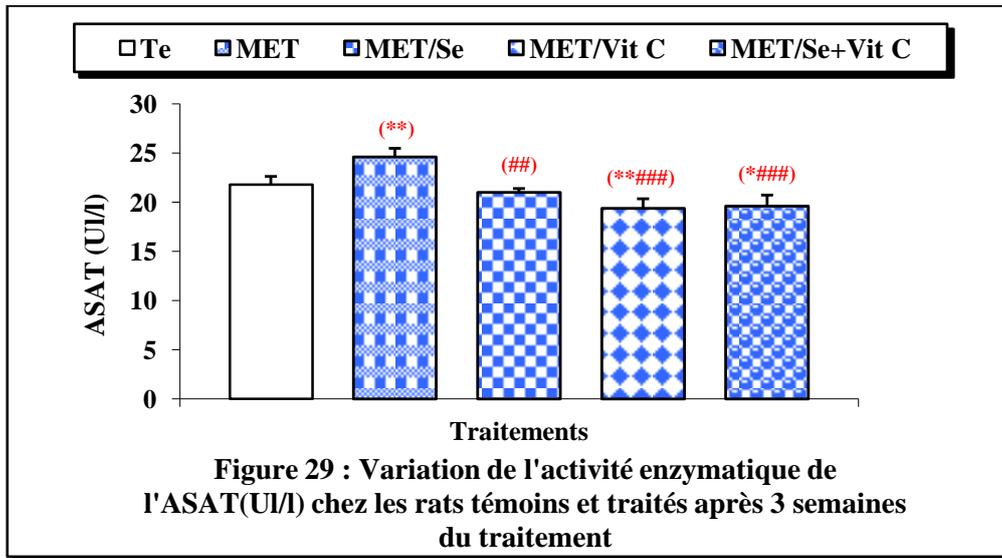
* $p \leq 0.05$ comparant aux témoins.



** $p \leq 0.01$ comparant aux témoins ;

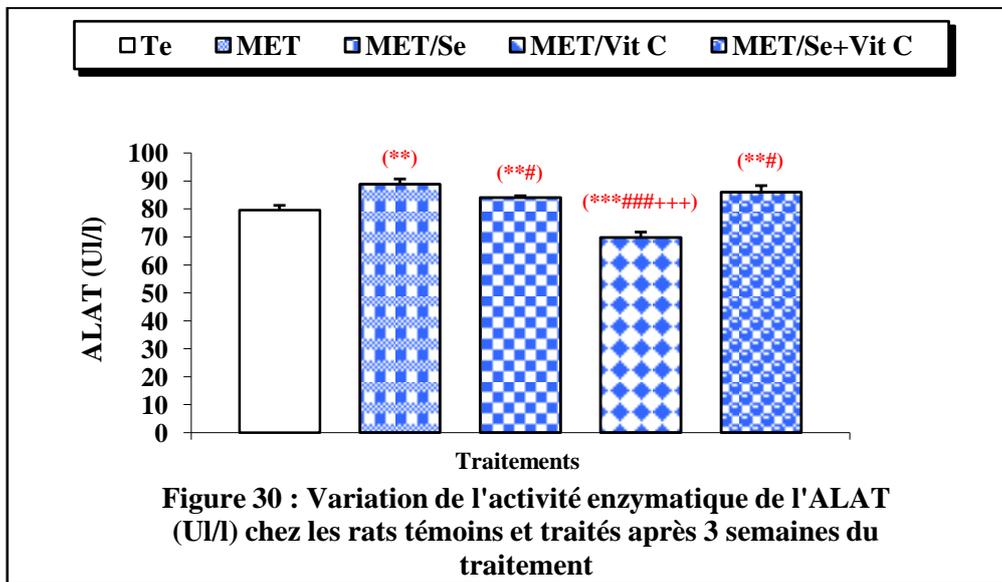
$p \leq 0.01$ comparant aux traités par MET ;

++ $p \leq 0.01$ traités par MET/Se ou Vit C comparant aux traités par MET/Se+Vit C.



* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$ comparant aux témoins ;

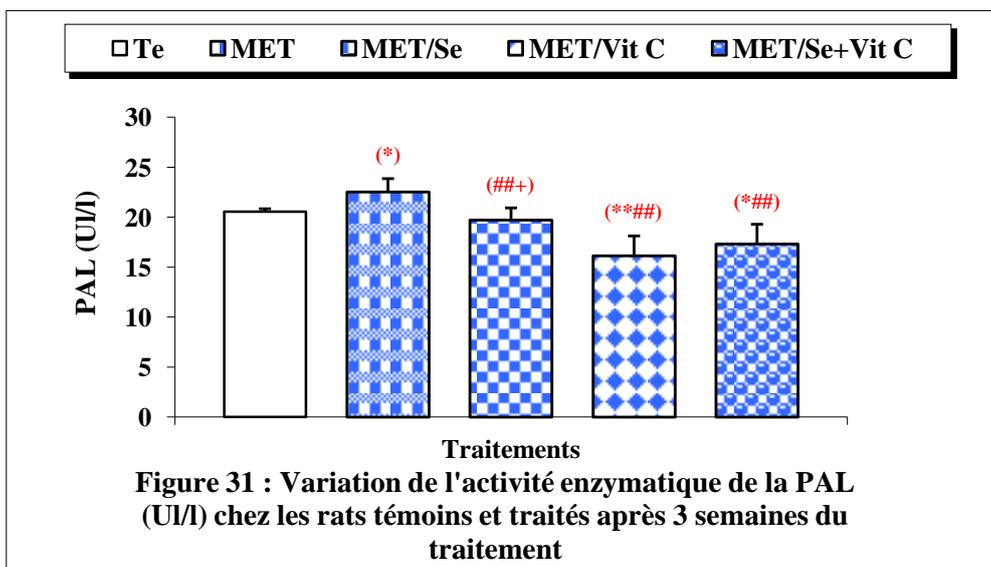
$p \leq 0.01$; ### $p \leq 0.001$ comparant aux traités par MET.



** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.01$ comparant aux témoins ;

$p \leq 0.05$; ### $p \leq 0.001$ comparant aux traités par MET ;

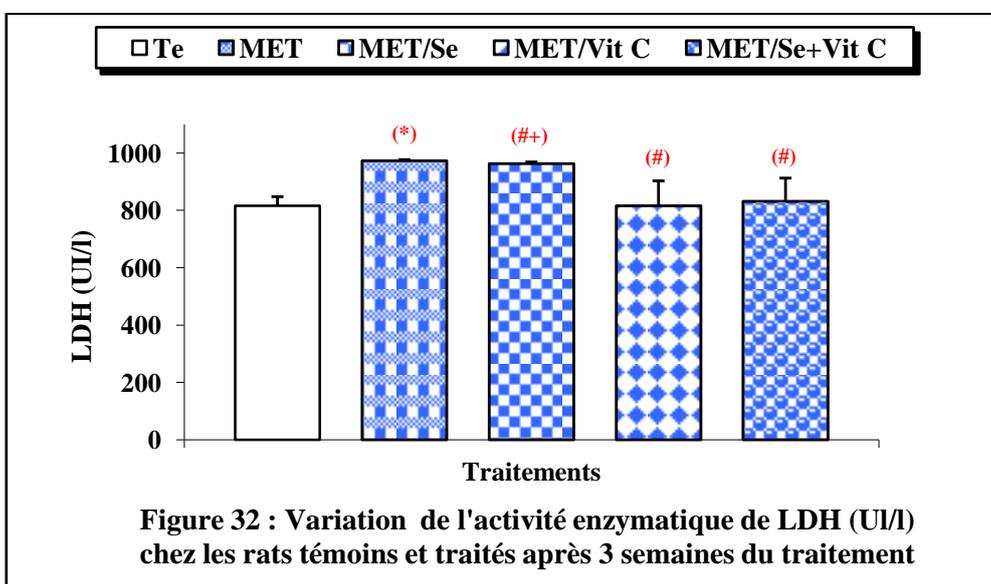
+++ $p \leq 0.001$ traités par MET/Se ou Vit C comparant aux traités par MET/Se+Vit C.



* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$ comparant aux témoins ;

$p \leq 0.01$ comparant aux traités par MET ;

+ $p \leq 0.05$ traités par MET/Se ou Vit C comparant aux traités par MET/Se+Vit C.



* $p \leq 0.05$ comparant aux témoins ;

$p \leq 0.05$ comparant aux traités par MET ;

+ $p \leq 0.05$ traités par MET/Se ou Vit C comparant aux traités par MET/Se+Vit C.

2. Impact sur l'histoarchitecture du foie

L'histologie du foie des rats traités par le méthomyl à 8 mg/kg de poids corporel pendant 3 semaines du traitement (figure 33.B) révèle des changements histologiques caractérisés par une congestion de la veine centrolobulaire et une destruction hépatocytaire comparativement aux témoins. Ces altérations graves de la structure affectent la fonction hépatique et peuvent contribuer à un dysfonctionnement de cet organe. Par ailleurs, on note des améliorations au niveau de l'histoarchitecture du foie chez les rats traités par la combinaison méthomyl plus sélénium et vitamine C (figure 33.E) comparant au rats recevant le méthomyl.

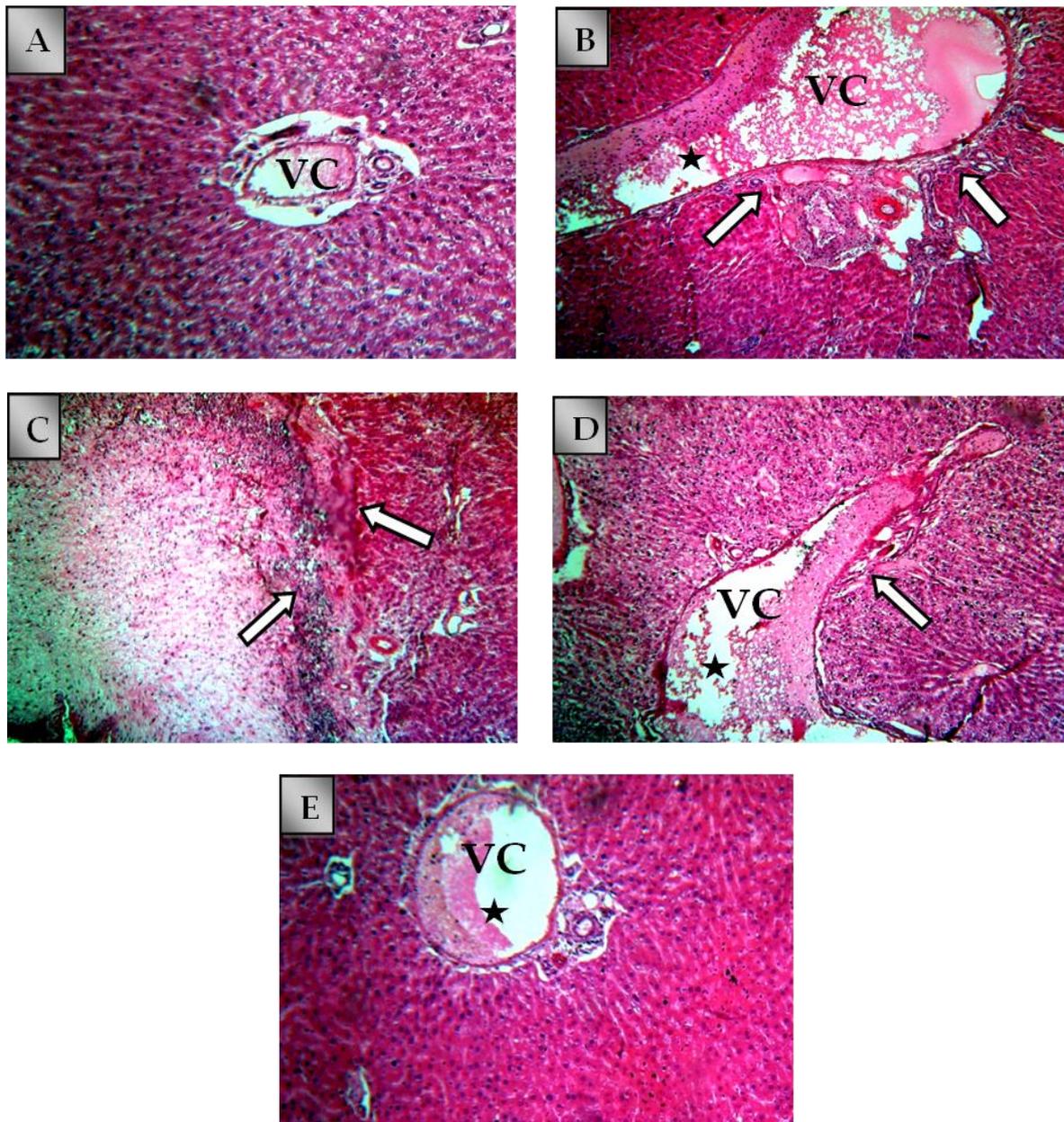


Fig. 33 : Histologie du foie chez les rats témoins et traités : **(A)** histologie du foie de groupe témoin montrant une architecture normale ; **(B)** histologie du foie de groupe traité par MET ; **(C)** histologie du foie de groupe traité par MET/Se ; **(D)** histologie du foie de groupe traité par MET/Vit C ; **(E)** histologie du foie de groupe traité par MET/Se+Vit C après 3 semaines du traitement.

Coloration, **H**ématoxyline-**E**osine. Microscopie optique (X400).

Légende :

VC : Veine centrolobulaire, congestion (★) ;

⇒ : Destruction hépatocytaire.

❖ Discussion

Les carbamates sont largement utilisés dans des buts industriels, agricoles et de santé publique et dans les produits de ménage et les jardins. Ils ont été détectés dans les eaux de puits et certaines plantes.

Les insecticides, même dans des concentrations très basses, interfèrent avec le métabolisme basal (Al-Shinnawy, 2008). Plusieurs études ont montré que les insecticides carbamates peuvent altérer les paramètres biochimiques chez des animaux d'expérience (Garg et al., 2009 ; 2009a ; Karami-Mohajeri et Abdollahi, 2011). Dans notre étude expérimentale, l'administration de méthomyl à raison de 8mg/kg de poids corporel, pendant 3 semaines chez les rats, a entraîné des perturbations au niveau des paramètres biochimiques.

Le pancréas, qui a un rôle critique dans la sécrétion de l'insuline, du glucagon et des enzymes digestives, est un organe cible dans la toxicité des pesticides. L'effet du pesticide sur cet organe peut altérer le métabolisme des hydrates de carbone (Karami-Mohajeri et Abdollahi, 2011).

L'analyse des résultats obtenus a montré une augmentation significative en glucose plasmatique chez les rats traités par le méthomyl. Cet état est dû aux effets du stress oxydant induit par cet insecticide. En effet, le stress oxydant est responsable d'une multitude de dysfonctions métaboliques qui est un facteur clé caractéristique de la résistance à l'insuline (Izquierdo-Vega et al., 2006). Les travaux de recherche de El Missiry et Othman (1993) ont montré également que l'administration du lannate a provoqué une augmentation significative de glucose parallèlement à l'augmentation d'urée azotée sanguin (blood urea nitrogen, BUN), indiquant ainsi un état d'hyperglycémie, où l'incapacité de métaboliser les hydrates de carbone est accompagnée de la diminution des globulines qui sont catabolisés comme source d'énergie au lieu du glucose. L'apparition d'une pancréatite aiguë chez un homme de 18ans après l'ingestion du méthomyl qui est accompagnée d'une augmentation de la concentration en glucose sanguin confirme ces suggestions (Makrides et al., 2005).

D'autres études ont aussi montré une augmentation de glucose après exposition à des insecticides carbamates comme le thiodicarbe (Al-Shinnawy, 2008) et le carbamate 8-hydroxy quinaldine *N-N'*-diméthyle-carbamate diméthyle sulfate (Zaahkouk et al., 2000).

En plus, l'inhibition de l'acétylcholinestérase par le lannate cause l'augmentation de la libération de l'acétylcholine dans la circulation, stimule ainsi une hypersécrétion des

catécholamines chez les rats. Ces derniers stimulent à leur tour la glyco-génolyse par l'intervention du système d'adénylcyclase donc l'apparition de l'hyperglycémie (El Missiry et Othman, 1993).

La bilirubine est l'un des biomarqueurs les plus sensibles et directement impliqués dans l'ampleur des dommages et de la toxicité hépatique. Nos résultats montrent aussi une augmentation significative en bilirubine chez les rats traités par le méthomyl. L'élévation de la bilirubine plasmatique indique le dysfonctionnement dans le foie. Ces observations sont en accord avec d'autres études (Yousef *et al.*, 2003 ; El-Demerdash *et al.*, 2004 ; Yousef, 2004 ; Ben Amara *et al.*, 2011). Cette augmentation peut être aussi résulter de la production accrue de bilirubine suite à l'hémolyse après l'exposition des rats à l'insecticide (El-Zahar *et al.*, 1996 ; Rana *et al.*, 1996).

Le foie, principal organe de détoxification, est capable de neutraliser toutes les substances toxiques. Vu son rôle dans la transformation des xénobiotiques environnementaux à savoir le méthomyl, le foie présente un grand risque de dommages (Karami-Mohajeri et Abdollahi, 2011). Des études antérieures, réalisées sur des rats adultes, ont montré que le méthomyl peut induire l'endommagement du foie par l'élévation des taux sanguins en transaminases (ASAT et ALAT), PAL et LDH.

Les transaminases (ASAT et ALAT), PAL et LDH dans le plasma reflètent l'activité fonctionnelle du foie. Ces enzymes sont principalement utilisées dans l'évaluation des dommages et du dysfonctionnement hépatiques.

Nos résultats ont prouvé que l'administration du méthomyl a causé une lésion hépatique chez les rats, démontré par l'augmentation significative des niveaux plasmatiques des transaminases suggérant que l'excessive utilisation de cet insecticide pourrait causer des dommages critiques à l'organe. L'augmentation de l'activité enzymatique de ces enzymes est en accord avec les résultats de plusieurs recherches suite à l'exposition au méthomyl d'une part (Fayez et Bahig, 1991 ; El Missiry et Othman, 1993 ; Makrides *et al.*, 2005 ; Patil *et al.*, 2008 ; Garg *et al.*, 2009a ; El-Fakharany *et al.*, 2011 ; El-Demerdash *et al.*, 2012) et à l'exposition aux différents insecticides d'autre part (Gupta *et al.*, 1993 ; Choudhary *et al.*, 2003 ; Ksheerasagar et Kaliwal, 2006 ; Al-Shinnawy, 2008 ; Brkiæ *et al.*, 2008 ; Fetoui *et al.*, 2009 ; Saoudi *et al.*, 2011). Ceci pourrait être dû à l'hépatotoxicité qui mène à l'altération de la perméabilité de la membrane plasmatique donc la fuite des enzymes du tissu vers le plasma ou à l'apparition de la nécrose du foie (Navarro *et al.*, 1993 ; El-Demerdash *et al.*, 2012). En

outre, le niveau de l'ALAT plasmatique est également utile en indiquant l'existence des affections hépatiques, car cette enzyme est présente en grande quantité dans le foie. Il augmente dans le plasma quand la dégénération ou la destruction cellulaire se produit dans cet organe (Hassoun et Stohs, 1995).

Les phosphatases sont des enzymes critiques dans le système biologique, responsables du métabolisme, de la détoxification, et de la biosynthèse des macromolécules énergétiques pour les différentes fonctions physiologiques. L'interférence avec ces enzymes mène aux perturbations biochimiques, aux lésions tissulaires et la perte de fonction cellulaire.

La phosphatase alcaline (PAL) est responsable de la dégradation des esters de phosphate en plus, elle est utilisée comme indicateur de l'état des voies d'absorption et de transport dans la membrane cellulaire.

Nos résultats montrent aussi une augmentation de l'activité enzymatique de la phosphatase alcaline dans le plasma des rats recevant le méthomyl. Rahman *et al.* (2000) ont proposé que la diminution des activités de la PAL et de l'acide phosphatase (AcP) dans différents tissus puisse être due à l'augmentation de la perméabilité de la membrane plasmique ou à la nécrose cellulaire, montrant l'état d'un stress dans l'animal traité. En outre, ils ont rapporté que l'augmentation de leurs activités dans le sérum peut être due à la nécrose des tissus mous.

L'augmentation de l'activité de PAL chez les rats provoqué par le méthomyl est en accord avec les conclusions rapportées par El Missiry et Othman (1993), Patil *et al.* (2008), Garg *et al.* (2009a), El-Fakharany *et al.* (2011) et El-Demerdash *et al.* (2012). D'autres études ont aussi montré l'augmentation de l'activité de PAL suite à l'exposition aux insecticides carbamates, comme le carbofuran (Pach *et al.*, 1998 ; Brkiæ *et al.*, 2008) et le carbaryl (Sharma, 1999 ; Eraslan *et al.*, 2009).

Lactate déshydrogénase (LDH) joue un rôle principal dans le cycle glycolytique de la cellule pour la conservation de l'énergie stockée (pyruvate ou lactate), cette enzyme est libérée par plusieurs tissus suite à des dommages oxydatifs (Hamdy, 1993 ; Lohitnavy et Sinhasan, 1998). L'élévation de l'activité de LDH indique aussi un mécanisme compensatoire par les tissus affectés qui exigent d'énergie additionnelle pour son entretien (El-Demerdash *et al.*, 2012).

Les résultats concernant l'activité de LDH montrent une augmentation chez les rats contaminés au méthomyl comparés aux témoins.

Plusieurs études ont montré l'augmentation de l'activité plasmatique de LDH suite à l'exposition au méthomyl (Makrides et *al.*, 2005 ; El-Demerdash et *al.*, 2012) et à différents insecticides (Fetoui et *al.*, 2009 ; Saoudi et *al.*, 2011).

L'hypercholestérolémie et l'hypertriglycéridémie sont des facteurs de risque pour prévoir les maladies cardiovasculaires. En effet, les triglycérides sont les principales constituants des membranes cellulaires, l'augmentation de leur concentration est probablement le résultat de l'apoptose (Al-Shinnawy, 2008).

Les insecticides carbamates augmentent généralement les niveaux du cholestérol total, des triglycérides et des lipides totaux (Eraslan et *al.*, 2009 ; Karami-Mohajeri et Abdollahi, 2011).

En effet, dans notre étude, le méthomyl a augmenté les niveaux du cholestérol, des triglycérides et des lipides totaux au niveau de plasma des rats. Cette augmentation en cholestérol sérique peut être attribuée à l'effet des pesticides sur la perméabilité de la membrane cellulaire du foie et/ou le dysfonctionnement hépatique prouvé par les perturbations de l'activité des transaminases et la bilirubine (Yousef et *al.*, 2003).

Manawadi et Kaliwal (2010) ont montré que l'exposition au méthomyl provoque un déficit en vitamine C dans le foie dû au stress oxydant, conduit ainsi à une réduction dans la synthèse des acides biliaires ou le catabolisme du cholestérol, dû à l'altération de l'activité des enzymes microsomiales, cholestérol 7 α -hydroxylase. L'acide ascorbique est un cofacteur important dans l'hydroxylation du noyau du cholestérol en C7. Le déficit en vitamine C induit un taux élevé du cholestérol dans le plasma et le foie. En plus, ce déficit n'influence pas seulement la concentration du cholestérol ou des triglycérides mais aussi l'intégrité du système vasculaire.

En plus, l'élévation observée de concentration en cholestérol dans le sérum, qui est associée à l'augmentation en triglycérides, peut indiquer une possible peroxydation lipidiques membranaires (Saoudi et *al.*, 2011).

En outre, l'exposition au méthomyl a provoqué une légère diminution de la concentration sérique en protéines totales. Cette perturbation a été prouvée par l'augmentation de la concentration hépatique en protéines carbonylées dans l'étude de Manawadi et Kaliwal (2010) suite à l'exposition des souris au méthomyl. Parmi les diverses modifications oxydantes des acides aminés dans les protéines, la formation des protéines carbonylées peut être un biomarqueur tôt de l'oxydation des protéines par les ERO. Ces derniers sont connus

pour modifier ou inactiver les protéines dans une variété des voies. Généralement, les ERO peuvent causer des modifications réversibles et/ou irréversibles sur les protéines sensibles (Manawadi et Kaliwal, 2010).

Des modifications réversibles, habituellement aux résidus de cystéine, avec le rôle de la protection contre des dommages irréversibles et la modulation de la fonction de protéine. Des modifications irréversibles induites par les ERO, telles que la formation des carbonyles et l'accumulation des sous-produits des protéines carbonyles dans les tissus, sont généralement associées à la perte permanente de la fonction protéique et sont considérées comme indicateurs des dommages oxydatifs graves et des maladies dérivées du dysfonctionnement protéique. Les ERO peuvent réagir directement avec la protéine en oxydant les chaînes latérales de résidu d'acide aminé donnant des dérivés cétoniques ou aldéhydique, pouvant réagir avec les macromolécules telles que les sucres et les lipides, produisant des espèces réactives carbonylées qui peuvent à leurs tours réagir avec les protéines (Manawadi et Kaliwal, 2010).

Cette diminution en protéines totales est en accord avec d'autres études suite à l'exposition au méthomyl (El Missiry et Othman, 1993 ; Patil et *al.*, 2008) et d'autres insecticides carbamates, le carbaryl (Eraslan et *al.*, 2009) et le thiodicarbe (Dias et *al.*, 2013) et au diazinon, insecticide organophosphate (Messarah et *al.*, 2013 ; El-Demerdash et Nasr, 2014).

Ces modifications biochimiques sont corrélées avec l'étude histopathologique du foie des rats témoins et traités. Dans notre étude, on a noté des changements histologiques du foie des rats recevant le méthomyl caractérisés par une dilatation des espaces sinusoidales, une congestion de la veine centrolobulaire ainsi qu'un phénomène de nécrose cellulaire (cytolyses des hépatocytes) comparativement aux témoins. L'installation de changement de l'histoarchitecture du foie pourrait être due essentiellement à un effet toxique du méthomyl qui touche la structure des hépatocytes. Ces études sont en accord avec d'autres qui ont montré des changements histopathologiques des hépatocytes après exposition aux méthomyl (Radad et *al.*, 2009 ; El-Demerdash et *al.*, 2012). Les études de Banerjee et *al.* (1999) ont rapporté que l'exposition au méthomyl génère des dommages oxydants au niveau des cellules hépatiques par l'augmentation de la peroxydation lipidique membranaire et ceci pourraient augmenter l'apoptose.

Dans notre travail, le traitement par le sélénium et/ou la vitamine C au groupe traité par le méthomyl a amélioré les effets délétères de cet insecticide notamment la variation des paramètres biochimiques biomarqueurs de la fonction hépatique et l'histoarchitecture du foie chez les rats. En effet ces deux antioxydants peuvent stabiliser la membrane cellulaire hépatique et protéger les hépatocytes contre les effets toxiques du méthomyl.

Le sélénium est un élément trace de grande importance pour la santé et leur déficience peut conduire à plusieurs maladies. Il est essentiel pour le fonctionnement normal des voies métaboliques principales, y compris le métabolisme des hormones thyroïdiennes, les systèmes de défense antioxydantes et la fonction immunitaire, faisant donc de Se un élément essentiel pour le développement normal, la croissance, au métabolisme, et à la défense du corps (Brown et Arthur, 2001 ; Mézes et Balogh, 2009). Le sélénium est une partie intégrante de plus qu'environ 30 protéines connues (Dodig et Cepelak, 2004). Les effets protecteurs du Se semblent être principalement associés à sa présence dans les sélénoenzymes, qui sont connues pour protéger plusieurs composants cellulaires contre les dommages oxydatifs (Valko et *al.*, 2006).

En accord avec ces résultats, plusieurs études ont montré que le Se possède des effets protecteurs contre l'hépatotoxicité induite par certains insecticides (Ben Amara et *al.*, 2011; El-Demerdash et Nasr, 2014 ; Mossa et *al.*, 2014) et d'autres xénobiotiques (El-Demerdash, 2004 ; Viezeliene et *al.*, 2011 ; Messarah et *al.*, 2012 ; Joshi et *al.*, 2014).

Toutes les fonctions physiologiques et biochimiques connues de la vitamine C sont dues à son action en tant que donateur d'électron et de ce fait, elle est un agent réducteur. La vitamine C est un nutriment essentiel nécessaire en tant que cofacteur pour nombreuses enzymes et pour plusieurs processus physiologiques. Elle est également un antioxydant très efficace (Padayatty et *al.*, 2003). Même en faible concentration, la vitamine C peut protéger les macromolécules contre des dommages causés par les ERO qui peuvent être produits pendant le métabolisme normal aussi bien que l'exposition aux xénobiotiques et aux polluants. De plus, la vitamine C peut régénérer d'autres antioxydants tels que la vitamine E (Carr et Frei, 1999).

La vitamine C joue un rôle important dans la protection contre la toxicité des insecticides particulièrement dans la toxicité hépatique en tant qu'agent antioxydant et empêche l'effet délétère des ERO sur les cellules vitales (Sinisa et *al.*, 2008 ; Bashandy et AlWasel, 2011).

Plusieurs études ont montré leurs effets bénéfiques et protecteurs contre l'hépatotoxicité induite par plusieurs insecticides (Al-Shinnawy, 2008a ; Fetoui *et al.*, 2008 ; 2010 ; Kalender *et al.*, 2010 ; Saoudi *et al.*, 2011 ; Uzunhisarcikli et Kalender, 2011 ; Hussein *et al.*, 2012) et d'autres xénobiotiques (Yousef, 2004 ; Shalan *et al.*, 2005 ; Bashandy et AlWasel, 2011 ; Prabu *et al.*, 2011).

Chapitre III : Néphrotoxicité induite par le méthomyl : Effets protecteurs de la supplémentation en sélénium et/ou en vitamine C

1. Action sur la variation de la concentration plasmatique en urée et créatinine

Le tableau 9 résume certains biomarqueurs plasmatiques de la fonction rénale des rats témoins et traités par le méthomyl et les combinaisons méthomyl plus sélénium et/ou vitamine C après 3 semaines du traitement.

Tab.9 : Variation de la concentration plasmatique en urée et créatinine chez les rats témoins et traités après 3 semaines du traitement.

Paramètres	Lots expérimentaux				
	Témoin	MET	MET/Se	MET/Vit C	MET/Se+Vit C
Urée (g/l)	0.406±0.05	0.532±0.02 ^(*)	0.492±0.01 ^(*#)	0.490±0.02 ^(*##)	0.446±0.02 ^(##)
%	–	+31.03%	+ 21.18%	+ 20.69%	+ 9.85%
Créatinine (mg/dl)	4.2±0.27	5.6±0.22 ^(*)	4.4±0.55 ^(*#)	3.6±0.55 ^(*##)	3.6±0.55 ^(*##)
%	–	+33.33%	+4.76%	-14.29%	-14.29%

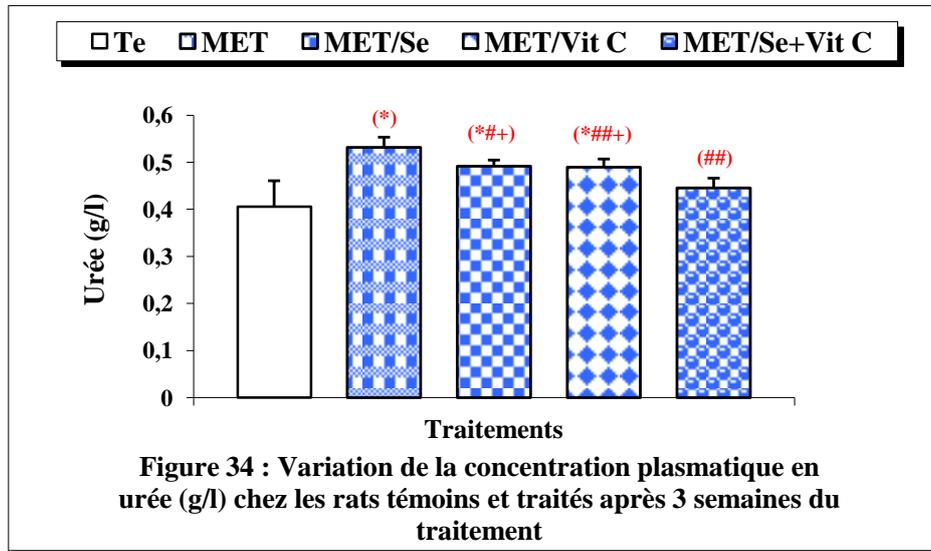
* p ≤ 0.05 ; ** p ≤ 0.01 comparant aux témoins ;

p ≤ 0.05 ; ## p ≤ 0.01 comparant aux traités par MET ;

+ p ≤ 0.05 traités par MET/Se ou Vit C comparant aux traités par MET/Se+Vit C.

Nos résultats montrent une augmentation significative du taux sérique en urée et créatinine chez le groupe traité par le méthomyl par rapport au groupe témoin. Tandis qu'on enregistre une variation significative du taux plasmatique en urée chez les lots traités par la combinaison méthomyl plus sélénium ou vitamine C et du taux plasmatique en créatinine chez les lots recevant les combinaisons méthomyl plus sélénium et/ou vitamine C comparant au lot témoin.

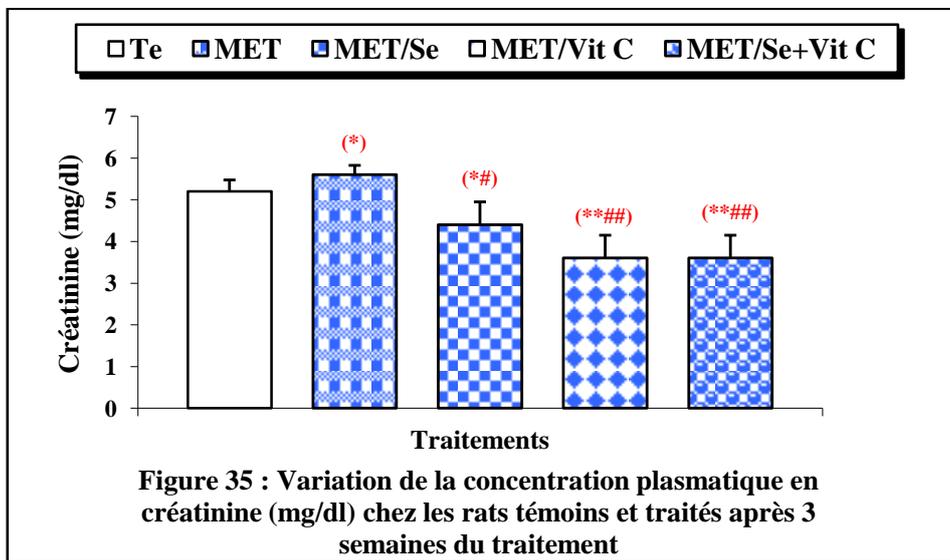
Par contre, on note un rétablissement par une diminution significative de l'urée et la créatinine chez les rats traités par les combinaisons méthomyl plus sélénium et/ou vitamine C par rapport au rats traité par le méthomyl (tableau 9 ; figures 34 et 35).



* $p \leq 0.05$ comparant aux témoins ;

$p \leq 0.05$; ## $p \leq 0.01$ comparant aux traités par MET ;

+ $p \leq 0.05$ traités par MET/Se ou Vit C comparant aux traités par MET/Se+Vit C.



* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$ comparant aux témoins ;

$p \leq 0.05$; ## $p \leq 0.01$ comparant aux traités par MET.

❖ Discussion

Le rein est un organe cible pour les composés xénobiotiques notamment les polluants environnementaux suite au volume sanguin supplémenté élevé et leur rôle en concentrant les solutés. Cette susceptibilité du rein à la toxicité produit une variété d'effets toxiques rénaux impliquant les cellules tubulaires et glomérulaire (Mohamed et *al.*, 2003).

L'urée et la créatinine sanguines des animaux d'expérience sont parmi les paramètres essentiels pour évaluer la fonction rénale et la filtration glomérulaire (Fingo, 1997).

L'augmentation des taux plasmatique en urée et en créatinine chez les rats exposés au méthomyl est considérée comme biomarqueur de la dysfonction rénale et les dommages provoqués par cet insecticide. Ces résultats sont en accord avec d'autres études dans lesquelles le dommage rénal a été occasionné chez des ouvriers professionnellement exposés au méthomyl (Khan et *al.*, 2008), dans un cas de suicide (Makrides et *al.*, 2005) et chez les animaux d'expérience (Fayez et Bahig, 1991 ; El-Demerdash et *al.*, 2013) suite à l'exposition au méthomyl. Ces observations dans notre étude peuvent être référées indirectement à l'effet hépatotoxique du méthomyl (données montrées), puisque l'urée est le produit final du catabolisme des protéines. En plus, l'augmentation en urée et créatinine plasmatique indiquent la capacité diminuée des reins de filtrer ces déchets du sang et de les excréter dans l'urine. Une association entre l'hyperuricémie et les dommages rénaux a été rapporté par Feig et *al.* (2006). L'élévation du taux d'acide urique, ainsi que les modifications histologiques des reins rapportés par Radad et *al.* (2009), EL-Fakharany et *al.* (2011) et El-Demerdash et *al.* (2013), indiquent clairement l'induction du dysfonctionnement et des dommages rénaux provoqués par le méthomyl.

En revanche, l'administration de sélénium et/ou de la vitamine C aux rats traités par le méthomyl a restauré les taux sériques en urée et en créatinine. Ce résultat peut être dû soit à l'activité antioxydante remarquable de ces deux antioxydants qui a été révélée par plusieurs études, soit à ces actions bénéfiques au niveau des reins. En effet, le sélénium et la vitamine C protègent le rein contre l'effet néfaste du méthomyl, ils augmentent les processus de défense cellulaire vis-à-vis les effets cytotoxiques du stress oxydant induit par cet insecticide et réduise la production des radicaux libres.

Des études récentes réalisées par Soudani et *al.* (2010) ont démontré que la néphrotoxicité induite par le chrome est contractée par le traitement au sélénium suite à leur propriété antioxydante puissante. D'autres études ont montré aussi l'effet protecteur de sélénium contre les dommages rénaux induits par le diazinon (El-Demerdash et Nasr, 2014), le methimazole, antithyroïdien (Ben Amara et *al.*, 2011a) et certains métaux lourds (Li et *al.*, 2008 ; Ognjanovic et *al.*, 2008).

L'effet protecteur de la vitamine C a été démontré par Bashandy et AlWasel (2011) avec le traitement des rats par le tétrachlorure de carbone (CCl₄). Ceci est le résultat de l'effet de vitamine C dans la réduction de la peroxydation lipidique induite dans le tissu rénal et la correction de l'épuisement en glutathion réduit. D'autres recherches ont montré aussi l'effet bénéfique de vitamine C contre la néphrotoxicité induite par certains insecticides comme les organophosphates, le méthyle parathion (Kalender et *al.*, 2007) et les pyréthroïdes synthétiques, le deltaméthrine (Saoudi et *al.*, 2011) et le fenvalérate (Hussein et *al.*, 2012).

Chapitre IV : Impact du méthomyl sur la fonction thyroïdienne : Effets protecteurs de la supplémentation en sélénium et/ou en vitamine C

1. Action sur les poids absolu et relatif de la thyroïde

Nous avons suivi l'évolution des poids absolu (PA) et relatif (PR) de la thyroïde chez les rats témoins et les rats recevant le méthomyl et les combinaisons méthomyl plus sélénium et/ou vitamine C.

Les résultats obtenus montrent qu'il y a eu une augmentation significative des poids absolu et relatif de la thyroïde chez le groupe traité par le méthomyl comparant au groupe témoin. On note aussi une variation significative du poids relatif de la thyroïde chez les rats recevant la combinaison méthomyl plus sélénium par rapport aux rats témoins.

En revanche, on enregistre un rétablissement par une diminution significative des poids absolu et relatif de la thyroïde chez les groupes traités par les combinaisons méthomyl plus sélénium et/ou vitamine C comparant aux rats traités par le méthomyl.

On note aussi une variation statistiquement significative chez les groupes traités par la combinaison méthomyl plus sélénium ou vitamine C comparant aux rats traités par la combinaison méthomyl plus sélénium et vitamine C (tableau 10 ; figure 36).

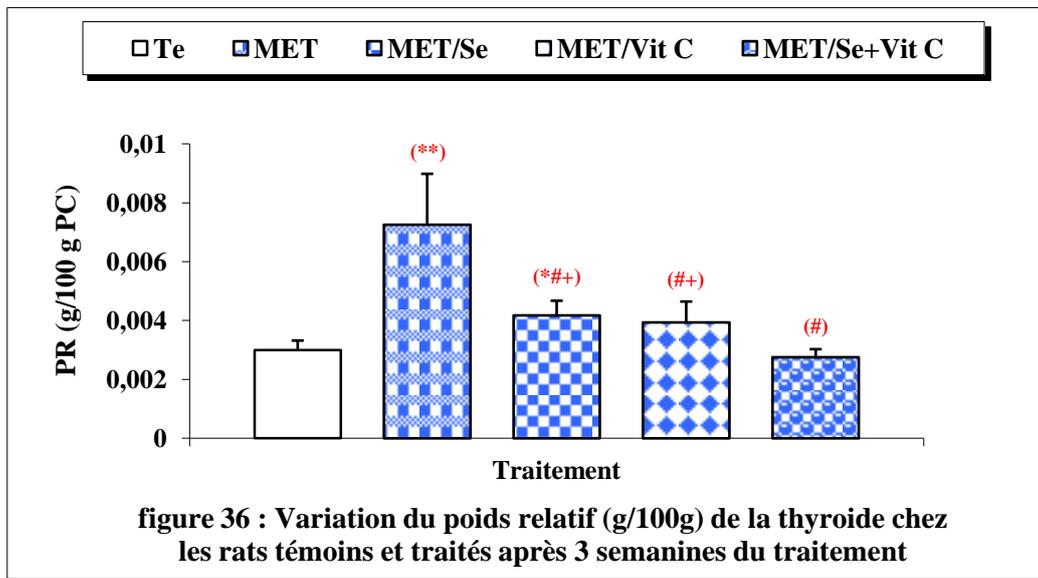
Tab.10 : Variation des poids absolu (PA) (g) et relatif (PR) (g/100g de PC) de la thyroïde chez les rats témoins et traités après 3 semaines du traitement.

Paramètres	Lots expérimentaux				
	Témoin	MET	MET/Se	MET/Vit C	MET/Se+Vit C
PA de thyroïde (g)	0.0076±0.001	0.016±0.003(*)	0.009±0.001(#+)	0.0084±0.002(#+)	0.0064±0.002(#+)
%	—	+ 110.53%	+ 18.42%	+ 10.53%	- 15.79%
PR de thyroïde (g/100g de PC)	0.003±0.0003	0.0073±0.002(**)	0.0042±0.0005(*#+)	0.0039±0.001(#+)	0.0028±0.0003(#+)
%	—	+ 143.33%	+ 40%	+ 30%	- 6.67%

* p ≤ 0.05 ; ** p ≤ 0.01 comparant aux témoins ;

p ≤ 0.05 comparant aux traités par MET ;

+ p ≤ 0.05 traités par MET/Se ou Vit C comparant aux traités par MET/Se+Vit C.



* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$ comparant aux témoins ;

$p \leq 0.05$ comparant aux traités par MET ;

+ $p \leq 0.05$ traités par MET/Se ou Vit C comparant aux traités par MET/Se+Vit C.

2. Effet sur la thyroxine libre plasmatique (FT4)

Le tableau 14 et la figure 35 représentent la concentration plasmatique en thyroxine libre de lot témoin et des lots traités par le méthomyl et par les combinaisons méthomyl plus sélénium et/ou vitamine C après 3 semaines du traitement.

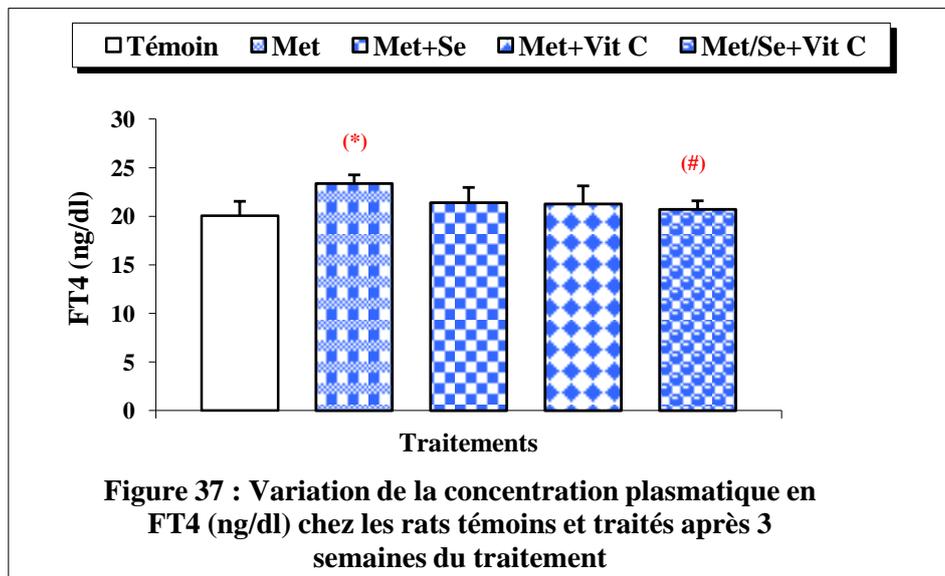
Nos résultats montrent une augmentation significative du taux plasmatique en thyroxine libre (FT4) chez le groupe traité par le méthomyl par rapport au groupe témoin. Par contre, on enregistre un rétablissement par une diminution statistiquement significative du taux plasmatique en FT4 chez les rats traités par la combinaison méthomyl plus sélénium et vitamine C comparant au lot traité par le méthomyl (tableau 11 ; figure 37).

Tab.11 : Variation de la concentration plasmatique en thyroxine libre (ng/dl) chez les rats témoins et traités après 3 semaines du traitement.

Paramètres	Lots expérimentaux				
	Témoin	MET	MET/Se	MET/Vit C	MET/Se+ Vit C
FT4 (ng/dl)	20.06±1.48	23.36±0.9 ^(*)	21.42±1.56	21.27±1.86	20.7±0.89 ^(#)
%	-	+ 16.45%	+ 6.78%	+ 6.03%	+ 3.19%

* p ≤0.05 comparant aux témoins ;

p ≤0.05 comparant aux traités par MET.



* p ≤0.05 comparant aux témoins ;

p ≤0.05 comparant aux traités par MET.

❖ Discussion

La thyroïde est une glande endocrine, responsable de la synthèse et la sécrétion des hormones thyroïdiennes (3,5,3'-triiodothyronine ou T3 et 3,5,3',5'-tetraiodothyronine ou T4). L'hormonosynthèse fait appel à la thyroperoxydase (TPO) et a un système générateur d' H_2O_2 , la NADPH oxydase thyroïdienne (THOX). Ces composés permettent l'iodation de résidus de tyrosine de la thyroglobuline (Tg) pour former des résidus de monoiodotyrosine (MIT) et de diiodotyrosine (DIT), puis le couplage de certains de ces résidus pour former T3 et T4 qui sont ensuite libérées par protéolyse. Ces hormones ont un rôle crucial dans la régulation de métabolisme glucidique, protéique, lipidique et phosphocalcique, dans la croissance, l'implication de la vasopressine (AVP) et dans la régulation de l'axe corticotrope (Kale et *al.*, 2006). Parmi les rôles les plus importants de la glande thyroïde sur les divers tissus des mammifères, nous distinguons sa capacité d'augmenter le taux métabolique basal, particulièrement celui des mitochondries. Ces dernières sont les sites principaux de production des espèces réactives de l'oxygène (ERO) dans les tissus sains suite à des fuites dans la chaîne respiratoire mitochondriale. Ces ERO provoquent des dommages oxydatifs aux macromolécules biologiques, y compris les lipides, les protéines et l'ADN (Das et Chainy, 2001; Fernandez *et al.*, 2006).

Cependant, la fonction de la glande thyroïdienne pourrait être empêchée ou activée, altérer ainsi plusieurs processus biochimiques et physiologiques, tels que le métabolisme cellulaire et les paramètres de stress oxydant (Kale et *al.*, 2006). L'hyperthyroïdisme est caractérisée par l'augmentation du taux métabolique cellulaire et ainsi une production accrue de radicaux libres (Kale et *al.*, 2006), une augmentation des niveaux de peroxydes et une augmentation (Morini et *al.*, 1991) ou une diminution (Fernandez et Videla, 1989) en enzymes antioxydantes, telles que la glutathion peroxydase. En effet, les travaux de Messarah et *al.*, (2007) ont montré l'installation d'un état de stress oxydant en relation avec l'hyperactivité thyroïdienne.

D'après nos résultats, on note que le taux de la thyroxine libre plasmatique a été augmenté après le traitement des rats par le méthomyl avec l'apparition d'un état de stress oxydant. Ces résultats sont en accord avec l'étude de Hassanin (2011) après le traitement des rats par deux insecticides, l'un est un carbamate tandis que l'autre est un organophosphoré. En

plus, nos résultats sont en accord avec d'autres travaux antérieurs de Hfaiedh *et al.* (2011) après le traitement des rats par un insecticide organochloré.

Il est bien connu que la concentration du T3 plasmatique est inférieure de celle du T4 mais l'hormone T3 est plus active, se lie faiblement avec les protéines sanguines et se dégrade rapidement que la T4 dans le sang (Silvestri *et al.*, 2005). Autrement, les pesticides exercent un effet délétère sur les cellules folliculaires morphologiques ou inhibent l'action des enzymes responsables de la conversion de T4 en T3 (Ahmed *et al.*, 2000).

Concernant le poids de la thyroïde, nous remarquons une augmentation de leurs poids absolu et relatif chez les rats recevant le méthomyl. Nous suggérons ainsi que l'administration de ce polluant pourrait provoquer une hypertrophie de la glande thyroïde chez les rats puisque son poids a augmenté. Le mécanisme de cette réponse est l'augmentation des taux plasmatiques en hormones thyroïdiennes.

En revanche, le traitement par le sélénium et la vitamine C a entraîné une amélioration du taux de FT4 et les poids absolu et relatif de la thyroïde, cette amélioration est due à l'effet protecteur et à la propriété antioxydante de sélénium et de la vitamine C contre la toxicité du méthomyl.

Chapitre V : Stress oxydant induit par le méthomyl : Effets protecteurs de la supplémentation en sélénium et/ou en vitamine C

1. Effet sur les taux du malondialdéhyde et du glutathion réduit tissulaires

Les données concernant la variation des taux du malondialdéhyde et du glutathion réduit au niveau de foie, reins et cerveau et dans les érythrocytes chez les rats témoins, traités par le méthomyl et par les combinaisons méthomyl plus sélénium et/ou vitamine C sont résumées dans le tableau 12.

Tab.12 : Variation de malondialdéhyde (nmol/mg protéine) et de glutathion réduit (nmol/mg protéine) au niveau de foie, reins et cerveau et dans les érythrocytes chez les rats témoins et traités après 3 semaines du traitement.

Paramètres	Organes	Lots expérimentaux				
		Témoin	MET	MET/Se	MET/Vit C	MET/Se+Vit C
Malondialdéhyde (nmol/mg protéine)	Foie	1.03±0.07	1.201±0.1 ^(*)	1.007±0.04 ^(#)	1.024±0.04 ^(#)	1.096±0.05
	%	–	+ 16.60%	- 2.23%	- 0.58%	+ 6.41%
	Reins	0.708±0.07	0.777±0.07 ^(*)	0.626±0.09 ^(#)	0.614±0.05 ^(#)	0.667±0.03 ^(#)
	%	–	+ 9.75%	- 11.58%	- 13.28%	- 5.79%
	Cerveau	0.458±0.02	0.516±0.03 ^(*)	0.479±0.01	0.400±0.06 ^(#)	0.450±0.02 ^(#)
	%	–	+ 12.66%	+ 4.58%	- 12.66%	- 1.75%
	Erythrocytes	0.534±0.05	0.683±0.05 ^(*)	0.501±0.05 ^(#+)	0.586±0.02 ^(#)	0.577±0.02 ^(#)
	%	–	+ 27.90%	- 6.18%	+ 9.74%	+ 8.05%
Glutathion réduit (nmol/mg protéine)	Foie	19.374±0.69	16.594±0.56 ^(**)	18.074±0.6 ^(*#)	18.818±0.63 ^(##)	18.920±0.57 ^(##)
	%	–	- 14.35%	- 6.71%	- 2.87%	- 2.34%
	Reins	5.722±0.28	4.902±0.36 ^(*)	5.304±0.3	5.374±0.23	5.390±0.35
	%	–	- 14.33%	- 7.30%	- 6.08%	- 5.80%
	Cerveau	5.238±0.16	4.794±0.13 ^(*)	5.264±0.14 ^(#)	5.142±0.32 ^(#)	5.262±0.18 ^(#)
	%	–	- 8.48%	+ 0.50%	- 18.33%	+ 0.46%
	Erythrocytes	157.96±5.99	114.75±12.69 ^(**)	141.46±5.44 ^(*#+)	141.90±5.64 ^(*#+)	159.91±6.67 ^(##)
	%	–	- 27.35%	- 10.45%	- 10.17%	+ 1.23%

* p ≤ 0.05 ; ** p ≤ 0.01 comparant aux témoins ;

p ≤ 0.05 ; ## p ≤ 0.01 comparant aux traités par MET ;

+ p ≤ 0.05 traités par MET/Se ou Vit C comparant aux traités par MET/Se+Vit C.

1.1. Taux du malondialdéhyde (MDA)

D'après les résultats obtenus, on observe une augmentation significative du taux de malondialdéhyde (MDA) au niveau de foie, reins et cerveau et dans les érythrocytes chez les rats recevant le méthomyl par rapport aux rats témoins.

Par contre, on enregistre un rétablissement par une diminution statistiquement significative du taux du MDA dans le foie chez les lots traités par la combinaison méthomyl plus sélénium ou vitamine C, dans le cerveau chez les groupes recevant les combinaisons méthomyl plus vitamine C et méthomyl plus sélénium et vitamine C et dans les reins et les érythrocytes chez les rats traités par les combinaisons méthomyl plus sélénium et/ou vitamine C par rapport au lot traité par le méthomyl (tableau 12 ; figure 38 et 39).

Chez les rats traités par la combinaison méthomyl plus sélénium, on enregistre une différence significative du taux du MDA dans les érythrocytes comparant aux rats traités par la combinaison méthomyl plus sélénium et vitamine C (tableau 12 ; figure 39).

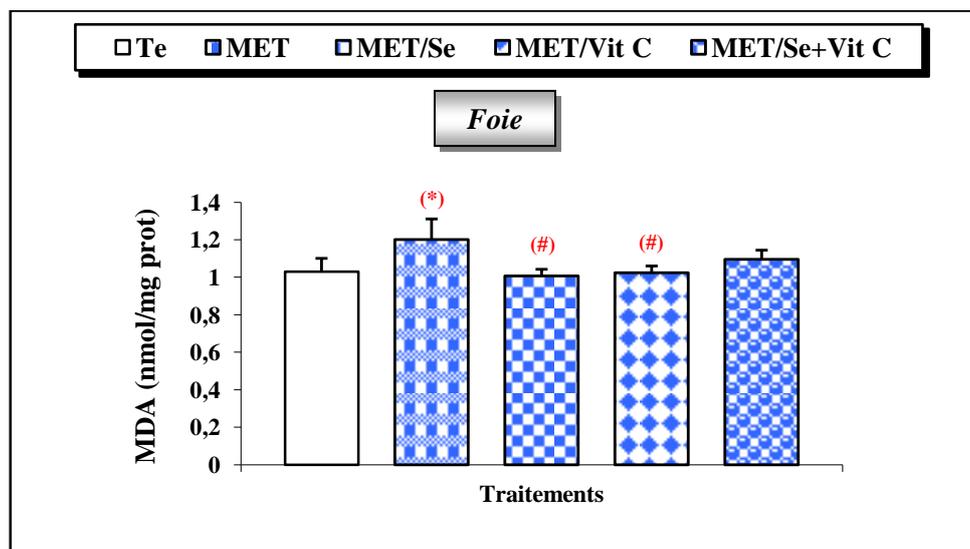
1.2. Taux du glutathion réduit (GSH)

Le traitement des rats par le méthomyl entraîne une diminution significative de la teneur cellulaire en glutathion réduit (GSH) au niveau de foie, reins et cerveau et dans les érythrocytes.

On enregistre aussi une différence significative du taux en GSH dans le foie et les érythrocytes chez les rats traités par la combinaison méthomyl plus sélénium et dans les érythrocytes chez le lot recevant la combinaison méthomyl plus vitamine C comparant aux rats témoins.

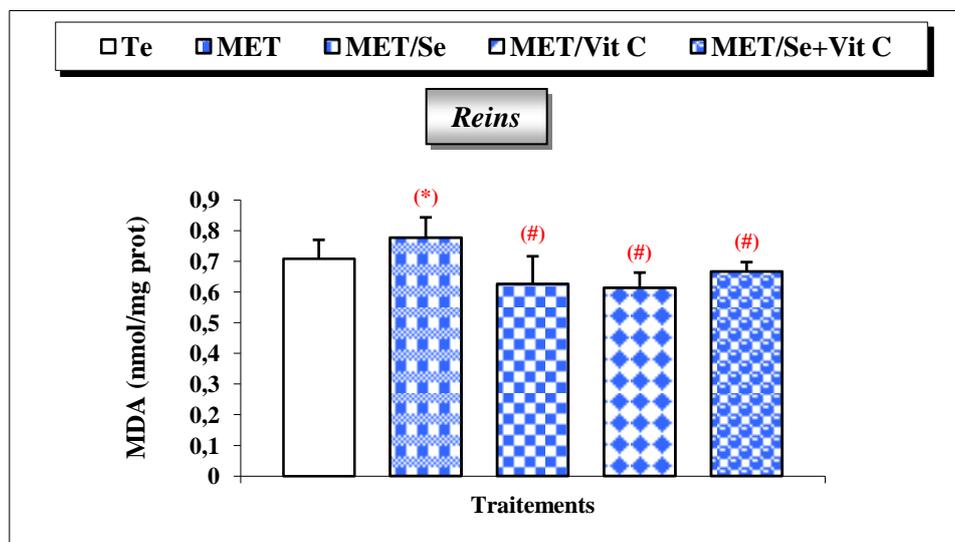
En revanche, on note un rétablissement par une augmentation significative du taux en GSH dans les organes, foie et cerveau et dans les érythrocytes chez les rats traités par les combinaisons méthomyl plus sélénium et/ou vitamine C par rapport aux rats traités par le méthomyl (tableau 12 ; figure 40 et 41).

Chez les rats traités par la combinaison méthomyl plus sélénium ou vitamine C, on enregistre une différence significative du taux en GSH dans les érythrocytes comparant aux rats traités par la combinaison méthomyl plus sélénium et vitamine C (tableau 12 ; figure 41).



* $p \leq 0.05$ comparant aux témoins ;

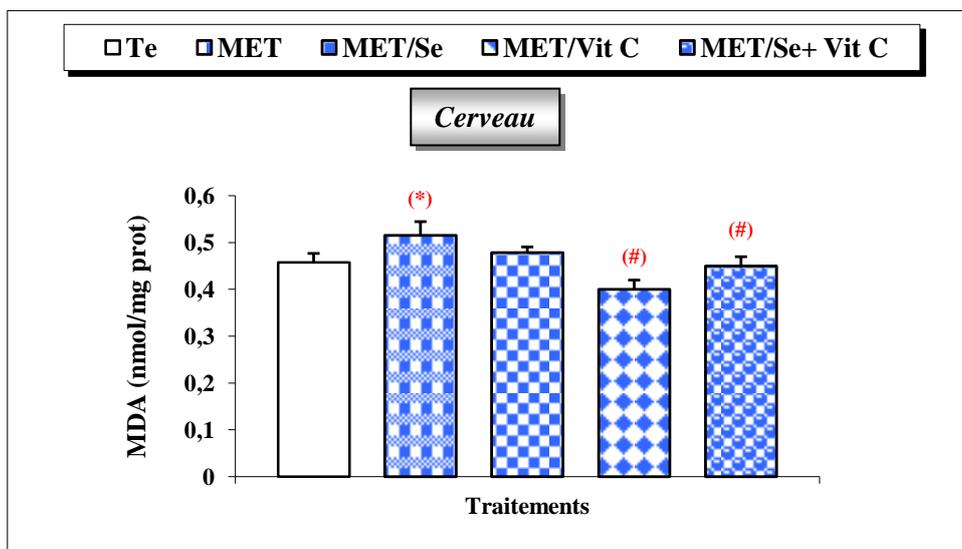
$p \leq 0.05$ comparant aux traités par MET.



* $p \leq 0.05$ comparant aux témoins ;

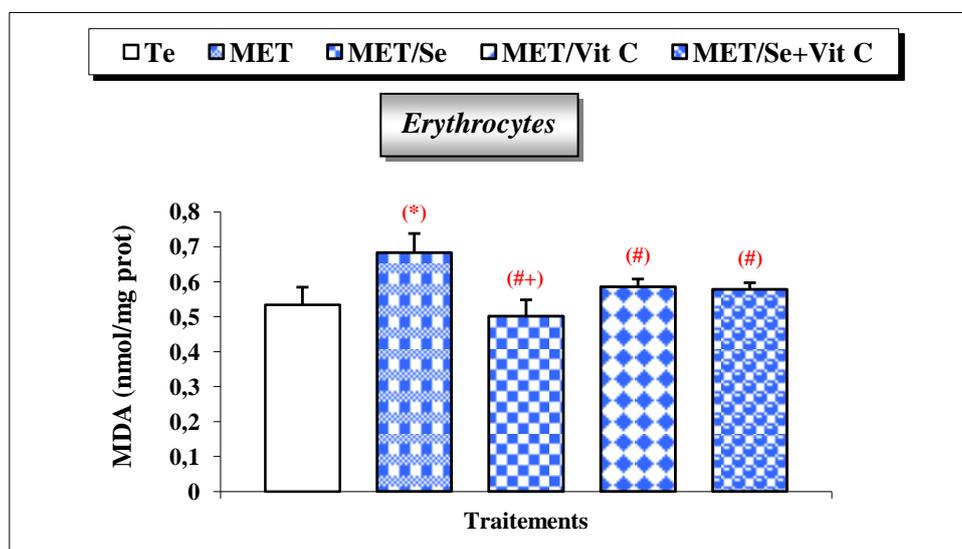
$p \leq 0.05$ comparant aux traités par MET.

Fig.38 : Variation du taux en malondialdéhyde (nmol/mg protéine) dans le foie et les reins chez les rats témoins et traités pendant 3 semaines du traitement.



* $p \leq 0.05$ comparant aux témoins ;

$p \leq 0.05$ comparant aux traités par MET.

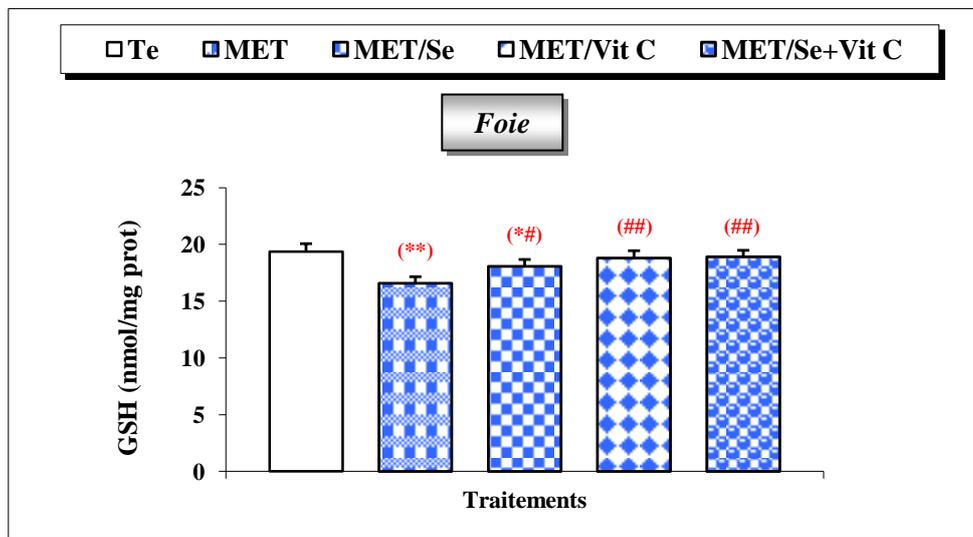


* $p \leq 0.05$ comparant aux témoins ;

$p \leq 0.05$ comparant aux traités par MET ;

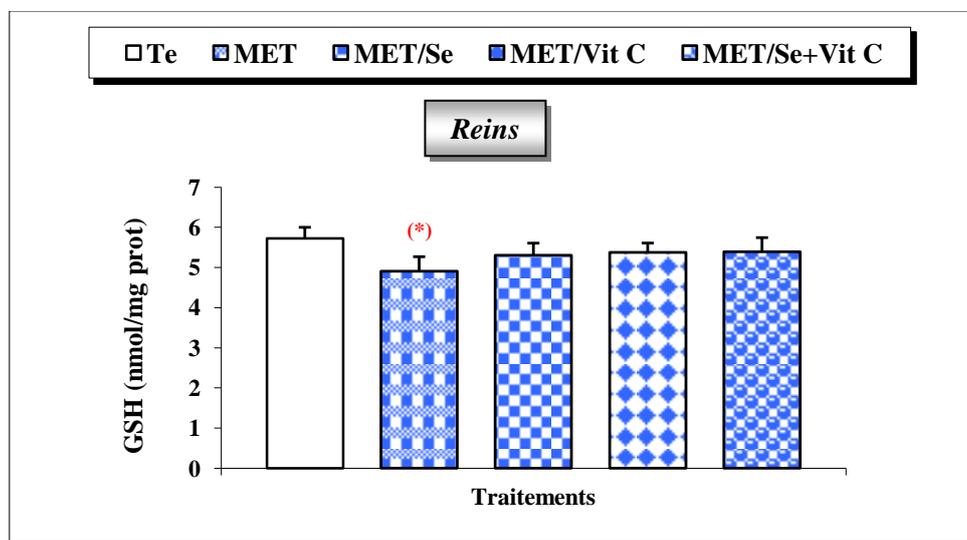
+ $p \leq 0.05$ traités par MET/Se ou Vit C comparant aux traités par MET/Se+Vit C.

Fig. 39 : Variation du taux en malondialdéhyde (nmol/mg protéine) dans le cerveau et les érythrocytes chez les rats témoins et traités pendant 3 semaines du traitement.



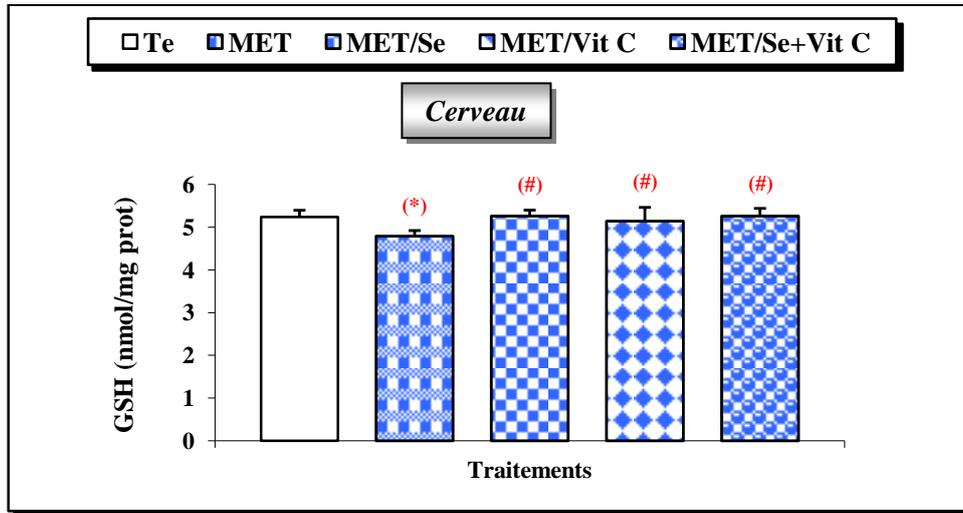
* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$ comparant aux témoins ;

$p \leq 0.05$; ## $p \leq 0.01$ comparant aux traités par MET.



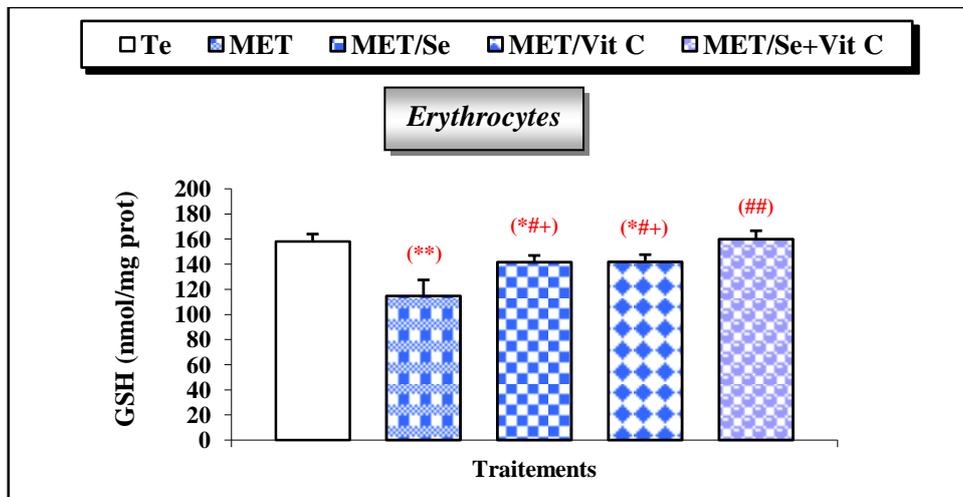
* $p \leq 0.05$ comparant aux témoins.

Fig.40 : Variation de la teneur cellulaire en glutathion (nmol/mg protéine) dans le foie et les reins chez les rats témoins et traités pendant 3 semaines du traitement.



* $p \leq 0.05$ comparant aux témoins ;

$p \leq 0.05$ comparant aux traités par MET.



* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$ comparant aux témoins ;

$p \leq 0.05$; ## $p \leq 0.01$ comparant aux traités par MET ;

+ $p \leq 0.05$ traités par MET/Se ou Vit C comparant aux traités par MET/Se+Vit C.

Fig.41 : Variation de la teneur cellulaire en glutathion (nmol/mg protéine) dans le cerveau et les érythrocytes chez les rats témoins et traités pendant 3 semaines du traitement.

2. Effet sur l'activité de quelques enzymes antioxydantes tissulaires

La variation de l'activité de certaines enzymes antioxydantes au niveau de foie, reins, cerveau et dans les érythrocytes des rats témoins, traités par le méthomyl et par les combinaisons méthomyl plus sélénium et/ou vitamine C est résumée dans le tableau 13.

Tab.13 : Activité enzymatique de la GPx (nmol GSH/mg protéine), la CAT ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{min}/\text{mg}$ de protéine) et la GST (nmol C-DNB/min/mg protéine) au niveau de foie, reins, cerveau et dans les érythrocytes chez les rats témoins et traités après 3 semaines du traitement.

Paramètres	Organes	Lots expérimentaux				
		Témoin	MET	MET/Se	MET/Vit C	MET/Se+Vit C
GPx (nmol GSH/mg protéine)	Foie	15.233±0.44	16.712±0.72 ^(*)	15.868±0.57 ^(#)	15.630±0.3 ^(#)	15.525±0.36 ^(#)
	%	-	+ 9.71%	+ 4.17%	+ 2.61%	+ 1.92%
	Reins	0.771±0.11	0.954±0.09 ^(**)	0.806±0.06 ^(#)	0.694±0.07 ^(###)	0.612±0.17 ^(####)
	%	-	+ 23.73%	+ 4.54%	- 9.99%	- 20.62%
	Cerveau	0.643±0.04	0.719±0.05 ^(*)	0.673±0.05 ⁽⁺⁾	0.546±0.04 ^(#+)	0.604±0.03 ^(#)
	%	-	+ 11.82%	+ 4.67%	- 15.08%	- 6.06%
	Erythrocytes	3.495±0.65	2.081±0.6 ^(*)	2.835±0.65	2.842±0.74	3.342±0.55 ^(#)
%	-	- 40.46%	- 18.88%	- 18.68%	- 4.38%	
CAT ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{min}/\text{mg}$ de protéine)	Foie	160.49±8.56	90.71±8.45 ^(***)	150.22±13.72 ^(###)	147.48±12.81 ^(###)	137.35±13.76 ^(###)
	%	-	- 43.48%	- 6.39%	- 8.11%	- 14.42%
	Reins	51.29±5.73	28.01±2.77 ^(**)	34.99±5.99 ^(**)	42.33±5.22 ^(*#)	36.32±3.07 ^(**#)
	%	-	- 45.39%	- 31.78%	- 17.47%	- 29.19%
	Cerveau	32.83±3.93	17.38±2.76 ^(**)	26.93±2.8 ^(#)	24.73±2.89 ^(*#)	27.96±3.15 ^(#)
	%	-	- 47.06%	- 17.97%	- 24.67%	- 14.83%
	Erythrocytes	124.44±7.8	84.11±5.59 ^(**)	115.49±8.7 ^(##+)	135.79±9.73 ^(##)	135.16±7.97 ^(##)
%	-	- 32.41%	- 7.19%	+ 9.12%	+ 8.61%	
GST (nmol C-DNB/min/mg protéine)	Foie	66.28±5.42	38.45±8.04 ^(**)	66.59±8.77 ^(##)	70.63±6.94 ^(##)	76.35±5.59 ^(###)
	%	-	- 41.99%	+ 0.47%	+ 6.56%	+ 15.19%
	Reins	0.644±0.07	0.404±0.05 ^(**)	0.653±0.12 ^(##+)	0.606±0.1 ^(##+)	0.926±0.1 ^(####)
	%	-	- 37.27%	+ 1.39%	- 59.01%	+ 43.79%
	Cerveau	0.404±0.07	0.278±0.07 ^(**)	0.339±0.06 ⁽⁺⁾	0.432±0.06 ^(##)	0.475±0.04 ^(##)
	%	-	- 31.19%	- 16.09%	+ 6.93%	+ 17.57%
	Erythrocytes	0.435±0.07	0.196±0.03 ^(**)	0.295±0.07 ^(*#)	0.306±0.06 ^(*#)	0.301±0.06 ^(#)
%	-	- 54.94%	- 32.18%	- 29.65%	- 30.80%	

* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.01$ comparant aux témoins ;

$p \leq 0.05$; ## $p \leq 0.01$; ### $p \leq 0.001$ comparant aux traités par MET ;

+ $p \leq 0.05$ traités par MET/Se ou Vit C comparant aux traités par MET/Se+Vit C.

2.1. Activité de la glutathion peroxydase (GPx)

Le traitement des rats par le méthomyl provoque une augmentation significative de l'activité enzymatique de la glutathion peroxydase (GPx) dans les organes, foie, reins et cerveau comparant aux rats témoins. En revanche, on enregistre un rétablissement par une diminution significative de l'activité de GPx dans le foie et les reins chez les lots traités par les combinaisons méthomyl plus sélénium et/ou vitamine C et dans le cerveau chez les lots traités par les combinaisons méthomyl plus vitamine C et méthomyl plus sélénium et vitamine C comparant au lot traité par le méthomyl (tableau 13 ; figure 42 et 43).

On note également une diminution significative de l'activité de la GPx dans les érythrocytes chez les rats recevant le méthomyl par rapport aux rats témoins. Par contre, on enregistre un rétablissement par une augmentation statistiquement significative chez le groupe traité par la combinaison méthomyl plus sélénium et vitamine C comparant au groupe traité par le méthomyl (tableau 13 ; figure 43).

2.2. Activité de la catalase (CAT)

Les résultats obtenus montrent que le traitement des rats par le méthomyl provoque une diminution significative de l'activité enzymatique de la catalase (CAT) dans les organes, foie, reins et cerveau et dans les érythrocytes par rapport aux rats témoins.

On note une différence significative de l'activité de la CAT dans le foie chez le groupe traité par la combinaison méthomyl plus sélénium et vitamine C, dans les reins chez les rats traités par les combinaisons méthomyl plus sélénium et/ou vitamine C et dans le cerveau chez le lot traité par la combinaison méthomyl plus vitamine C comparant au lot témoin.

En revanche, on enregistre un rétablissement par une augmentation significative de l'activité de la CAT dans le foie, le cerveau et les érythrocytes chez les rats traités par les combinaisons méthomyl plus sélénium et/ou vitamine C et dans les reins chez les rats traités par les combinaisons méthomyl plus vitamine C et méthomyl plus sélénium et vitamine C par rapport aux rats traités par le méthomyl.

On note une différence significative de l'activité de la CAT dans les reins chez le lot traité par la combinaison méthomyl plus vitamine C et dans les érythrocytes chez le lot traité par la combinaison méthomyl plus sélénium comparant au lot traité par la combinaison méthomyl plus sélénium et vitamine C (tableau 13 ; figure 44 et 45).

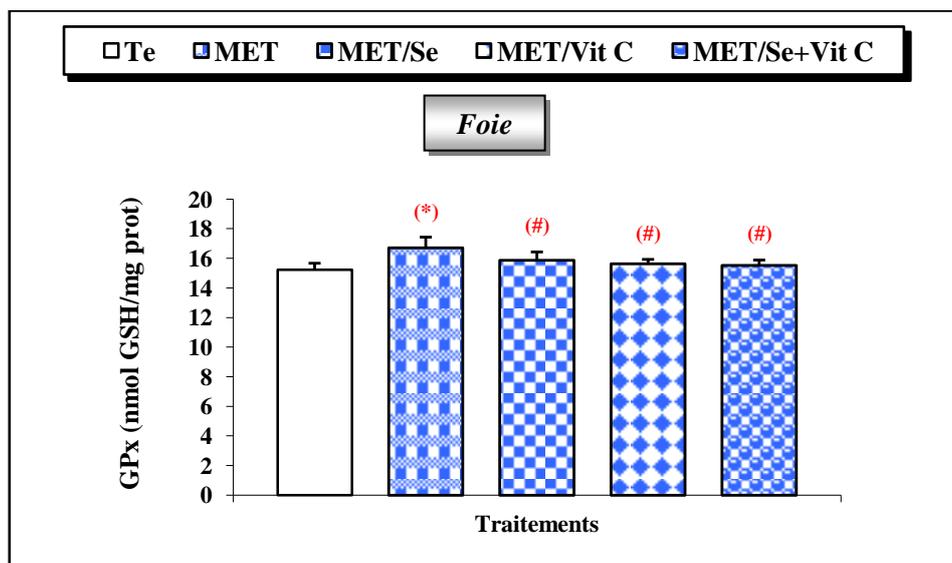
2.3. Activité de la glutathion S-transférase (GST)

L'administration du méthomyl pendant 3 semaines chez les rats induit une diminution significative de l'activité enzymatique de la glutathion S-transférase (GST) dans les organes, foie, reins et cerveau et dans les érythrocytes par rapport aux rats témoins.

On note une différence significative de l'activité de la GST dans les reins chez le lot traité par la combinaison méthomyl plus sélénium et vitamine C et dans les érythrocytes chez le lot traité par la combinaison méthomyl plus sélénium ou vitamine C comparant au lot témoin.

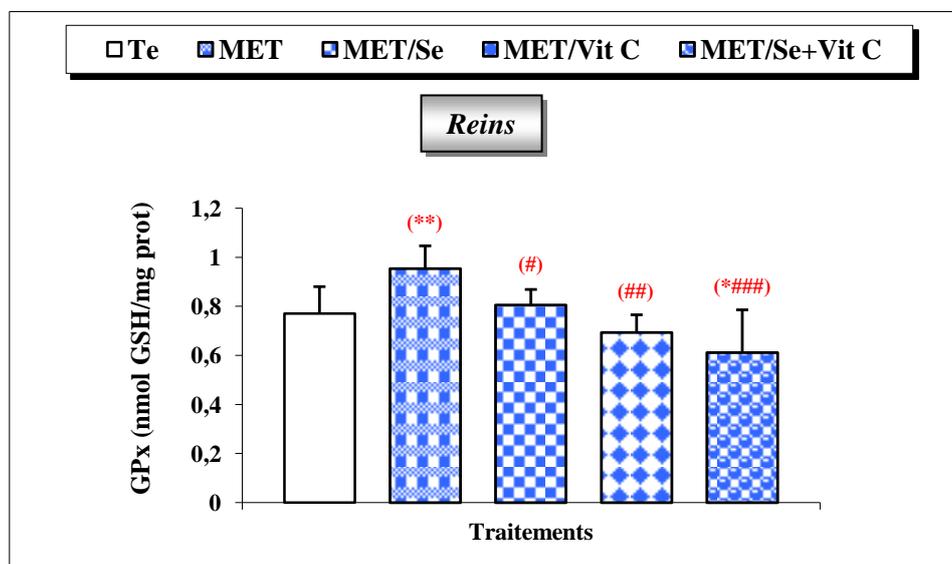
Tandis qu'on enregistre un rétablissement par une augmentation significative de l'activité de la GST dans le foie, les reins et les érythrocytes chez les rats recevant les combinaisons méthomyl plus sélénium et/ou vitamine C et dans le cerveau chez les rats recevant les combinaisons méthomyl plus vitamine C et méthomyl plus sélénium et vitamine C comparant aux rats recevant le méthomyl.

On note aussi une différence significative de l'activité de la GST dans les reins chez les lots traités par la combinaison méthomyl plus sélénium ou vitamine C et dans le cerveau chez le lot traité par la combinaison méthomyl plus sélénium par rapport au lot traité par la combinaison méthomyl plus sélénium et vitamine C (tableau 13 ; figure 46 et 47).



* $p \leq 0.05$ comparant aux témoins ;

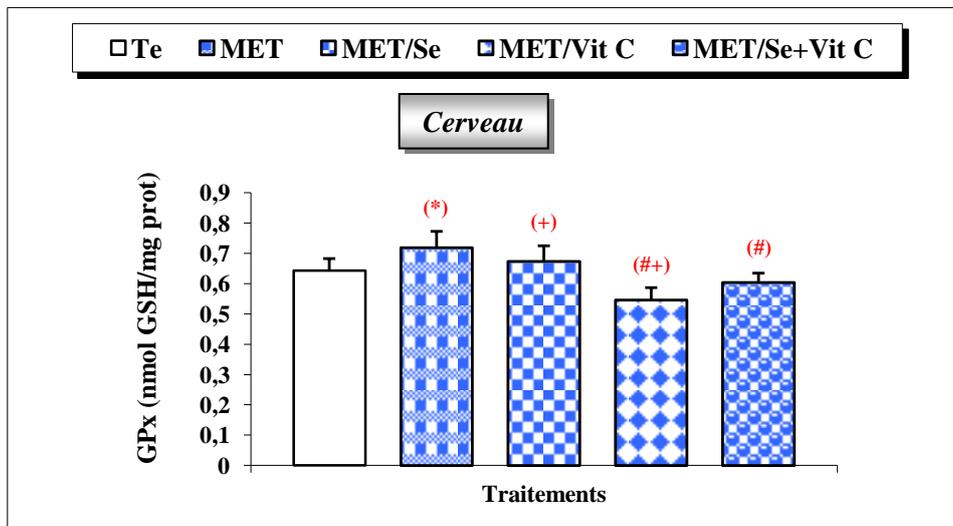
$p \leq 0.05$ comparant aux traités par MET.



* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$ comparant aux témoins ;

$p \leq 0.05$; ## $p \leq 0.01$; ### $p \leq 0.001$ comparant aux traités par MET.

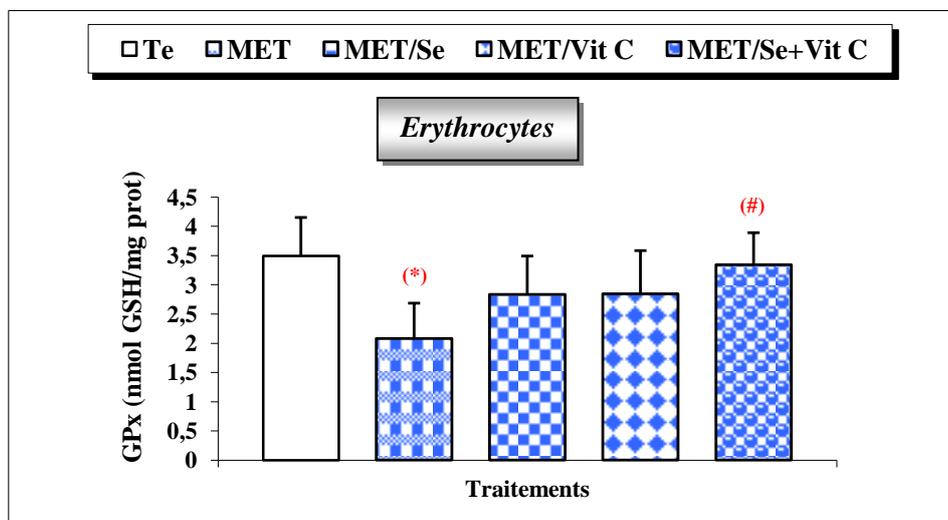
Fig.42 : Variation de l'activité enzymatique de la glutathion peroxydase (nmol GSH/protéine) dans le foie et les reins chez les rats témoins et traités pendant 3 semaines du traitement.



* $p \leq 0.05$ comparant aux témoins ;

$p \leq 0.05$ comparant aux traités par MET ;

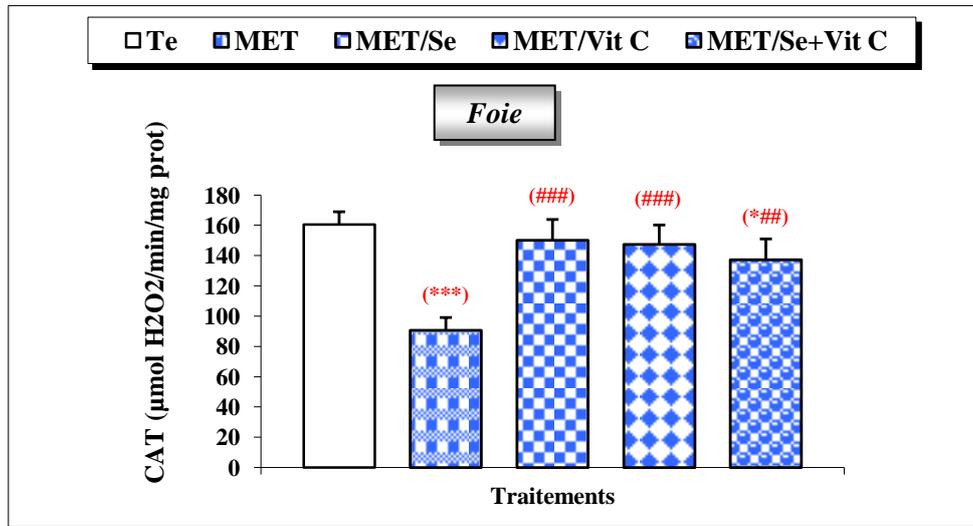
+ $p \leq 0.05$ traités par MET/Se ou Vit C comparant aux traités par MET/Se+Vit C.



* $p \leq 0.05$ comparant aux témoins ;

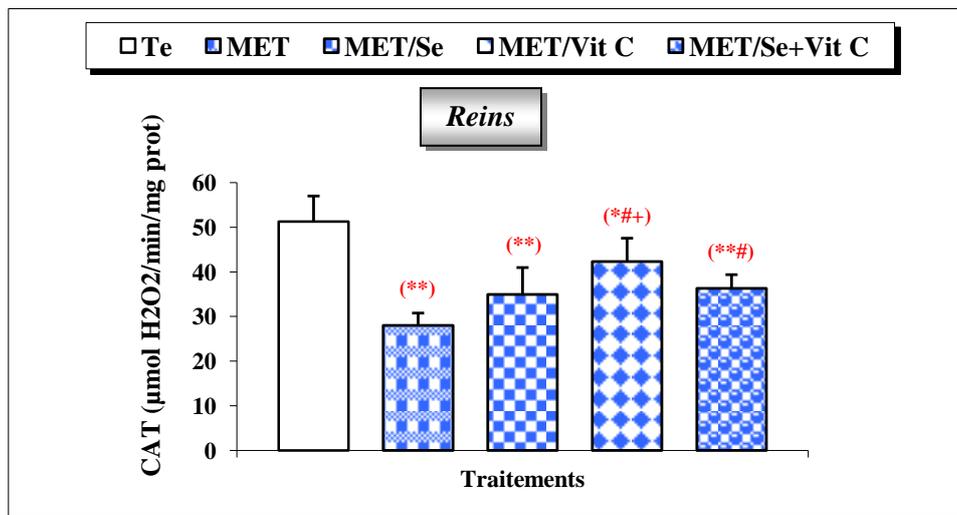
$p \leq 0.05$ comparant aux traités par MET.

Fig.43 : Variation de l'activité enzymatique de la glutathion peroxydase (nmol GSH/protéine) dans le cerveau et les érythrocytes chez les rats témoins et traités pendant 3 semaines du traitement.



* $p \leq 0.05$; *** $p \leq 0.01$ comparant aux témoins ;

$p \leq 0.001$ comparant aux traités par MET.

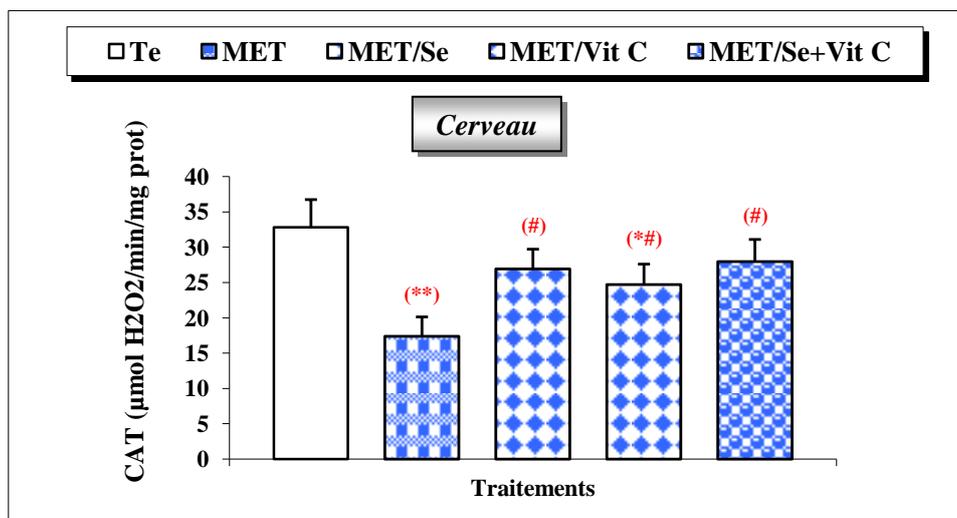


* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$ comparant aux témoins ;

$p \leq 0.05$ comparant aux traités par MET ;

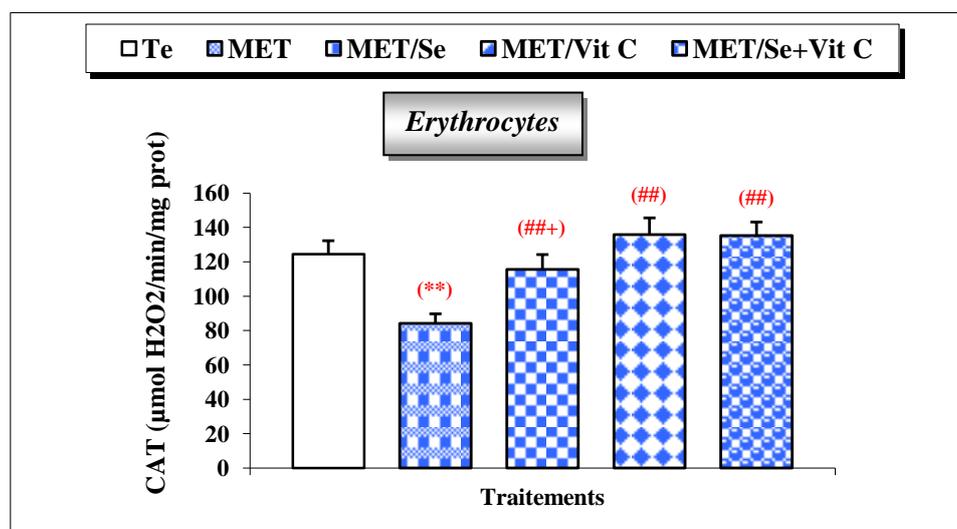
+ $p \leq 0.05$ traités par MET/Se ou Vit C comparant aux traités par MET/Se+Vit C.

Fig.44 : Variation de l'activité enzymatique de la catalase ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{min}/\text{mg}$ protéine) dans le foie et les reins chez les rats témoins et traités pendant 3 semaines du traitement.



* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$ comparant aux témoins ;

$p \leq 0.05$ comparant aux traités par MET.

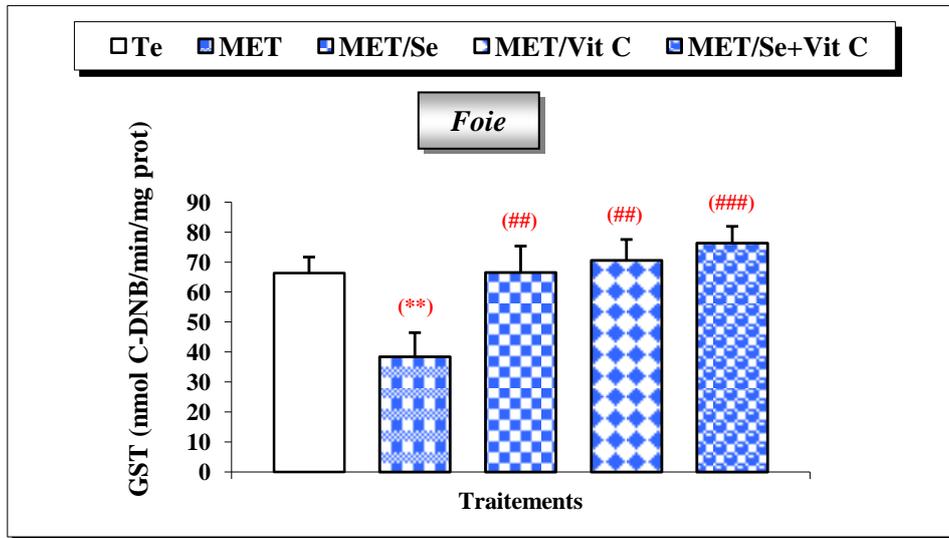


** $p \leq 0.01$ comparant aux témoins ;

$p \leq 0.01$ comparant aux traités par MET ;

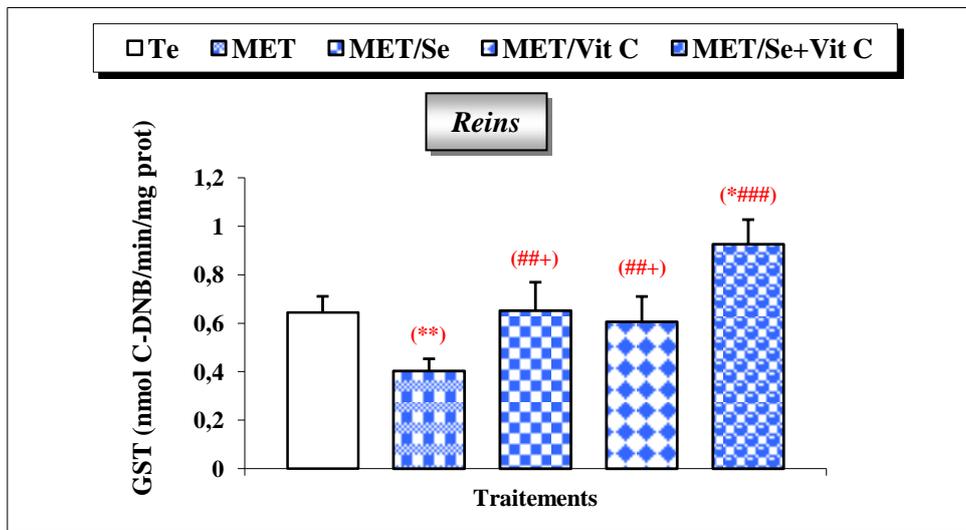
+ $p \leq 0.05$ traités par MET/Se ou Vit C comparant aux traités par MET/Se+Vit C.

Fig.45 : Variation de l'activité enzymatique de la catalase ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{min}/\text{mg}$ protéine) dans le cerveau et les érythrocytes chez les rats témoins et traités pendant 3 semaines du traitement.



** $p \leq 0.01$ comparant aux témoins ;

$p \leq 0.01$; ### $p \leq 0.001$ comparant aux traités par MET.

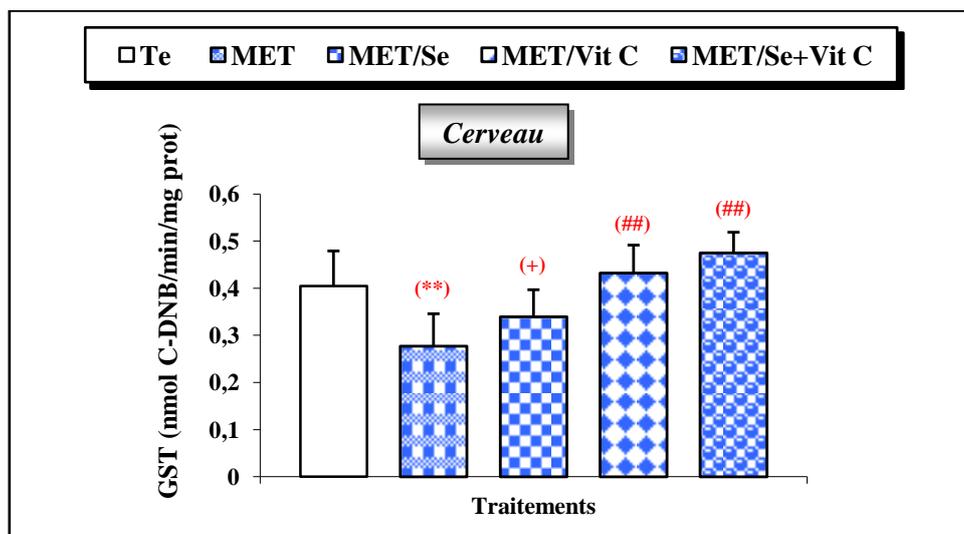


* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$ comparant aux témoins ;

$p \leq 0.01$; ### $p \leq 0.001$ comparant aux traités par MET ;

+ $p \leq 0.05$ traités par MET/Se ou Vit C comparant aux traités par MET/Se+Vit C.

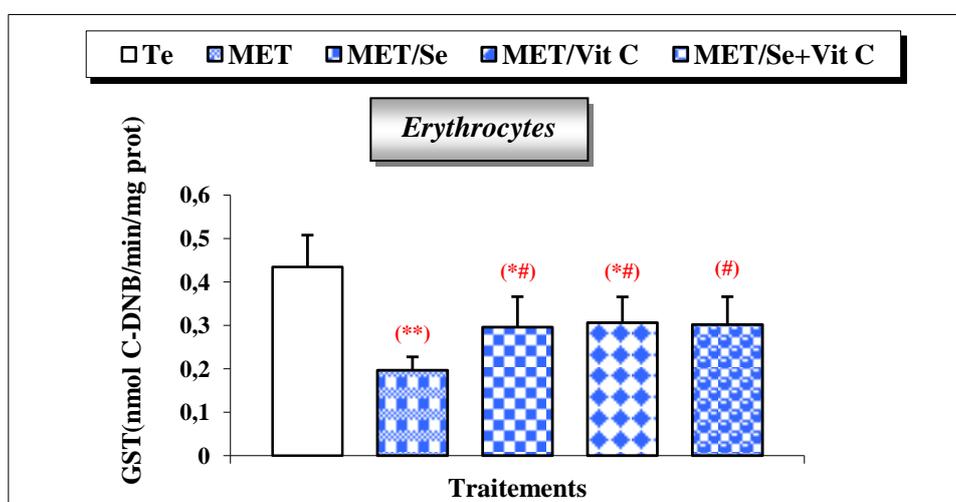
Fig.46 : Variation de l'activité enzymatique de la glutathion S-transférase (nmol C-DNB/min/mg protéine) dans le foie et les reins chez les rats témoins et traités pendant 3 semaines du traitement.



** p ≤ 0.01 comparant aux témoins ;

p ≤ 0.01 comparant aux traités par MET ;

+ p ≤ 0.05 traités par MET/Se ou Vit C comparant aux traités par MET/Se+Vit C.



* p ≤ 0.05 ; ** p ≤ 0.01 comparant aux témoins ;

p ≤ 0.05 comparant aux traités par MET.

Fig.47 : Variation de l'activité enzymatique de la glutathion S-transférase (nmol C-DNB/min/mg protéine) dans le cerveau et les érythrocytes chez les rats témoins et traités pendant 3 semaines du traitement.

❖ Discussion

Pendant ces deux décennies, la recherche toxicologique s'est concentrée sur l'induction du stress oxydant (SO) après exposition aux pesticides comme mécanisme possible de la toxicité. En fait, le SO est le résultat des processus de multi-étapes causant par un déséquilibre dans la balance entre les oxydants/prooxydants et les antioxydants (enzymatique et non enzymatique) et menant aux dommages tissulaires conduisant en premier lieu à de nombreuses maladies et finalement à l'apoptose (Agrawal et Sharma, 2010).

L'exposition aux pesticides peut induire un état de stress oxydant par : (1) production accrue des radicaux libres qui s'accumulent dans la cellule, (2) altération des mécanismes de défense antioxydante ; y compris la détoxification et les enzymes de balayage, ou (3) augmentation de la peroxydation lipidique suite à l'interaction entre les ERO et les membranes cellulaires ou sous-cellulaires (Abdollahi et *al.*, 2004).

Plusieurs recherches chez des animaux d'expérience ont rapporté que le SO joue un rôle important dans la toxicité de divers pesticides, y compris des organophosphates (OP) (Possamai et *al.*, 2007), des *N*-méthyle carbamates (NMC) (Mansour et *al.*, 2009), des organochlorés (OC) (Pal et *al.*, 2009), des pyréthroïdes (PYR) (Raina et *al.*, 2009), des triazines (Singh et *al.*, 2010), des néonicotinoïdes (El-Gendy et *al.*, 2010), des dithiocarbamates et du paraquat (Ahmad et *al.*, 2010). En plus, les études épidémiologiques chez l'homme après exposition de long terme à un mélange des pesticides (OPs, PYRs synthétiques et NMC) ont montré la stimulation des enzymes antioxydantes et l'induction de la peroxydation lipidique dans les érythrocytes même en l'absence d'une diminution d'acétylcholinestérase (Ogut et *al.*, 2011).

La peroxydation lipidique (LPO) est l'une des manifestations principales des dommages oxydatifs et s'est avérée avoir un rôle important dans la toxicité et la cancérogénicité de plusieurs xénobiotiques. La LPO est le processus de la dégradation oxydative des acides gras polyinsaturés et son occurrence dans les membranes biologiques cause des changements dans la structure et la fonction membranaires et mène à la diminution de la fluidité de la membrane et l'inactivation de plusieurs enzymes membranaires (Gutteridge et Halliwell, 2000).

Les taux du malondialdéhyde (comme produit final de LPO) ont été mesurés pour indiquer la génération des ERO et des dommages induits par la LPO tissulaire dans la toxicité des pesticides (Cemek et *al.*, 2010).

Divers pesticides, notamment les carbamates sont capables de générer des ERO (Stevenson et *al.*, 1995). Ces oxydants sont impliqués dans la toxicité des pesticides en raison de leurs effets nocifs sur la santé humaine. Dans cette optique, les radicaux libres générés « *in vivo* » sont responsables de l'induction du stress oxydatif. Les ERO produites dans les cellules tel que l'anion superoxyde, le peroxyde d'hydrogène et les radicaux hydroxyles, sont extrêmement réactives et ont des effets délétères sur la structure des protéines, des lipides et de l'ADN (Favier, 2003) et par conséquent, le foie, les reins, le cerveau et les érythrocytes se trouvent endommagés de manière irréversible (Agrawal et Sharma, 2010).

D'après la littérature, quelques études ont montré l'induction de stress oxydant suite à l'exposition *in vivo* ou *in vitro* à des insecticides carbamates tels que le propoxur, l'aldicarbe, le carbofuran et le carbaryl (Yarsan et *al.*, 1999 ; Seth et *al.*, 2001 ; Kaur et Sandhir, 2006 ; Suke et *al.*, 2006 ; Rai et Sharma, 2007 ; Kamboj et *al.*, 2008 ; Eraslan et *al.*, 2009 ; Maran et *al.*, 2010).

Dans la présente étude, l'exposition des rats au méthomyl dans l'eau de boisson a eu comme conséquence une augmentation significative de la peroxydation lipidique, indiquée par l'augmentation du taux en MDA dans plusieurs organes et dans les érythrocytes. Ceci montre bien que le méthomyl est capable de promouvoir la génération des ERO, qui se traduit par la peroxydation lipidique (LPO) dans les tissus hépatiques, rénaux et cérébraux et dans les érythrocytes et suggérant leurs effets délétères dans ces tissus.

Durant l'exposition, nos résultats révèlent que le méthomyl a induit la peroxydation des tissus mous. En effet, l'augmentation de la peroxydation cellulaire est dépendante de la concentration intracellulaire en radicaux libres. L'augmentation du taux des ERO à l'intérieur des cellules peut être due soit à une surproduction de ces substances réactives ou à une diminution de la capacité de les neutraliser (Sun, 2001 ; Kirschvink et *al.*, 2008). Par suite, il est bien connu que les ERO générées par les xénobiotiques interagissent avec les acides gras insaturés pour initier la LPO (Huimin et *al.*, 1994 ; Sener et *al.*, 2003) laquelle est un facteur important influençant la structure des biomembranes (Sun, 2001) des tissus mous.

Ces observations sont en accord avec plusieurs études quant à l'exposition au méthomyl dans différents organes et tissus chez les animaux d'expérience (Garg et *al.*, 2008 ;

2009 ; 2009a ; Mansour et *al.*, 2009 ; Manawadi et Kaliwal, 2010 ; EL-Demerdash et *al.*, 2012 ; 2013).

De même, Maran et *al.* (2010) ont rapporté que les insecticides carbamates et leurs produits de dégradation agissant sur les membranes, oxydant ses composants lipidiques et augmentant la production du MDA pendant leurs expositions. La LPO a été suggérée en tant qu'un des mécanismes moléculaires impliqués dans la toxicité induite par les pesticides (Ozden et *al.*, 2009).

En effet, le cerveau et les érythrocytes sont fortement susceptibles aux radicaux libres dus à leur activité métabolique oxydante accrue et leur teneur élevée en acides gras polyinsaturés (AGPI) (Evans, 1993). Rai et Sharma (2007) et Rai et *al.* (2009) ont signalé que le carbofuran (un insecticide carbamate) a causé la génération des ERO dans le cerveau et les érythrocytes de rat, respectivement et a augmenté significativement la LPO, aussi Gupta et *al.* (2009) a proposé que LPO pourrait être l'un des mécanismes de neurotoxicité associée à l'exposition au propoxur (un autre insecticide carbamate) et que le taux élevé du MDA chez les rats indique que ce composé a augmenté la peroxydation lipidique et a produit un état du stress oxydant.

Par ailleurs, l'administration du sélénium et/ou de la vitamine C au groupe traité par le méthomyl a diminué le taux du MDA dans les différents tissus des rats.

Les antioxydants protègent les cellules des dommages causés par les radicaux libres qui sont des sous-produits naturels du métabolisme de l'oxygène.

Le sélénium est une partie intégrante de la glutathion peroxydase. Cette enzyme détruit les peroxydes avant qu'ils puissent endommager les tissus du corps (EL-Demerdash, 2004). Plusieurs recherches ont montré l'effet protectif du Se contre l'induction du SO suite à l'exposition à des pesticides et des xénobiotiques par l'augmentation du taux du MDA (EL-Demerdash, 2004 ; Cemek et *al.*, 2010 ; Messaoudi et *al.*, 2010 ; Ben Amara et *al.*, 2011 ; Messarah et *al.*, 2012).

L'acide ascorbique est un antioxydant primaire dans le plasma. Il aide également dans le recyclage du tocophérol et contribue en synergie avec ce dernier dans la protection contre la LPO (Gupta et *al.*, 2009). La supplémentation avec la vitamine C apparaît plus efficace pour atténuer la peroxydation des lipides induite par le méthomyl. En effet, plusieurs recherches ont montré l'effet protecteur de la Vit C contre l'induction du SO après exposition à différents familles des pesticides par la diminution du taux du MDA (Fetoui et *al.*, 2008 ;

Gupta et *al.*, 2009 ; Aly et *al.*, 2010 ; El-Gendy et *al.*, 2010 ; Fetoui et *al.*, 2010 ; Saoudi et *al.*, 2011).

Le glutathion (GSH), un thiol antioxydant endogène est un agent réducteur physiologique responsable de maintenir le statut redox intracellulaire (Kamboj et *al.*, 2008). En outre, il joue un rôle majeur dans la protection et la détoxification contre les composés toxiques et les ERO en agissant comme cosubstrat d'enzymes antioxydantes telles que des GPx et des GST (Garg et *al.*, 2009).

Cette étude montre que le méthomyl provoque une diminution significative des niveaux du GSH dans les organes, foie, reins et cerveau et dans les érythrocytes des rats. L'épuisement significatif des niveaux de GSH confirme le potentiel du méthomyl d'induire un stress oxydant dans les différents tissus. Des résultats similaires ont été également rapportés dans différents organes et tissus suite à l'exposition au méthomyl (EL-Khawaga, 2005 ; Salama et *al.*, 2005 ; Garg et *al.*, 2008 ; 2009 ; 2009a ; Manawadi et Kaliwal, 2010 ; EL-Demerdash et *al.*, 2012 ; EL-Khawaga, 2012 ; EL-Demerdash et *al.*, 2013). Des résultats similaires ont été également rapportés dans différents organes et tissus suite à l'exposition des rats à d'autres insecticides carbamates, le carbofuran (Kamboj et *al.*, 2006 ; 2008 ; Rai et *al.*, 2009), l'aldicarb et le propoxur (Matos et *al.*, 2007 ; Maran et *al.*, 2010) et le methiocarb (Ozden et *al.*, 2009).

Il s'avère également que l'augmentation de la peroxydation lipidique est une conséquence de l'épuisement des réserves en glutathion réduit, qui sont capables de modérer la LPO (Garg et *al.*, 2008). Par conséquent, la réduction de la teneur en GSH est considérée comme un potentiel biomarqueur du stress environnemental. Cette réduction est due à la conjugaison du GSH avec le méthomyl car le GSH joue un rôle important dans la détoxification des xénobiotiques en tant que cofacteur pour la famille des GST et en tant qu'antioxydant important pour l'élimination des ERO (Li et *al.*, 2010 ; EL-Demerdash et *al.*, 2012).

Par ailleurs, le traitement par le sélénium et/ou la vitamine C a amélioré les niveaux de GSH dans les différents organes, foie, reins et cerveau et dans les érythrocytes chez le rat traité par le méthomyl.

En effet, le sélénium augmente la disponibilité du glutathion qui est l'un des antioxydants intrinsèques qui empêchent les dommages cellulaires (EL-Khawaga, 2005). Cette amélioration de la teneur en GSH en présence du Se est en accord avec les résultats

obtenues par El-Khawaga (2005) après traitement des rats avec le MET et par Cemek et *al.* (2010), Messaoudi et *al.* (2010), Ben Amara et *al.* (2011) et Messarah et *al.* (2012), après traitement avec des pesticides et d'autres xénobiotiques.

Le rôle principal de la vitamine C est de neutraliser les radicaux libres intra ou extracellulaires par leur propriété comme donneur d'électron pour neutraliser les RLs tels que les radicaux d'hydroxyle et de superoxyde et éteindre leur réactivité (Bendich, 1990). Cette amélioration par le Vit C est en bon accord avec ceux obtenus par Yousef (2004), Zaidi et Banu (2004), Fetoui et *al.* (2008), (2009), Gupta et *al.* (2009), Aly et *al.* (2010), El-Gendy et *al.* (2010), Fetoui et *al.* (2010) et Bashandy et AlWasel (2011), après traitement des rats avec des pesticides et d'autres xénobiotiques.

Les enzymes antioxydantes sont considérées comme la première ligne de la défense cellulaire contre les dommages oxydatifs. Ces enzymes regroupent plusieurs familles ; celle des GPx, des SOD et des GST, la CAT et la GR.

Ainsi, l'augmentation du stress oxydant et des dommages cellulaires, provoqués par le traitement avec le méthomyl étaient évidents par les perturbations dans les activités enzymatiques de GPx, CAT et GST dans le foie, reins, cerveau et érythrocytes des rats.

En effet, plusieurs recherches ont montré l'effet perturbateur du méthomyl sur le système enzymatique antioxydant dans différents organes et tissus *in vivo* ou *in vitro* (El-Khawaga, 2005 ; Garg et *al.*, 2008 ; 2009 ; 2009a ; Mansour et *al.*, 2009 ; Manawadi et Kaliwal, 2010 ; EL-Demerdash et *al.*, 2012 ; El-Khawaga, 2012 ; EL-Demerdash et *al.*, 2013).

La famille enzymatique des GPx catalyse la réduction de divers hydroperoxydes en alcools.

Les résultats de notre expérimentation ont montré une augmentation de l'activité de GPx dans les organes, foie, rein et cerveau après exposition au méthomyl chez les rats. En effet, l'élévation de l'activité enzymatique est afin de contrecarrer le stress oxydant induit par le méthomyl et une manière d'adaptation par l'organisme (Garg et *al.*, 2009a). Cette augmentation a pu être produite pour surmonter la production significative du peroxyde d'hydrogène due à la peroxydation lipidique et à la diminution de leur neutralisation par la CAT défectueuse ; produite après exposition aux pesticides (Samanta et Chainy, 1997).

Les érythrocytes humaines déficientes en GPx sont fortement susceptibles aux métabolites peroxydative des drogues ou des xénobiotiques et sont également enclins à

l'hémolyse induite par les peroxydes (Garg et al., 2009). Ces observations suggèrent que la GPx soit essentiel pour l'intégrité de la membrane érythrocytaires (Garg et al., 2008 ; 2009).

La catalase est une enzyme ubiquitaire et fait partie de la première ligne de défense antioxydante importante (Garg et al., 2008 ; 2009). Elle réduit l' H_2O_2 en H_2O et O_2 pour empêcher l'induction d'un état du SO, maintenir l'homéostasie des cellules et jouer un rôle important dans l'élimination des ERO (Manawadi et Kaliwal, 2010).

Dans notre travail, nous avons enregistré une diminution de l'activité enzymatique de la catalase suite à l'exposition des rats au méthomyl. La diminution observée de l'activité de la CAT et de la GPx pourrait probablement être due à l'utilisation de ces enzymes dans la conversion du H_2O_2 en H_2O (Garg et al., 2008 ; 2009).

Plusieurs études ont prouvé l'effet inhibiteur du méthomyl sur l'activité enzymatique de la CAT dans différents organes et tissus chez les animaux d'expérience (El-Khawaga, 2005 ; Garg et al., 2008 ; 2009a ; Manawadi et Kaliwal, 2010 ; El-Demerdash et al., 2012 ; El-Khawaga, 2012 ; EL-Demerdash et al., 2013).

La famille enzymatique des GST est impliquée dans les processus de la détoxification. En outre, une fonction importante de GST, en réponse au stress oxydant est sa capacité de conjuguer le GSH avec les produits de la peroxydation lipidique (Manawadi et Kaliwal, 2010).

La diminution de l'activité de GST observée dans la présente étude pourrait plus loin contribué à la peroxydation lipidique augmentée, représentée par les niveaux accrus du MDA (Zaidi et Banu, 2004). En outre, cette diminution reflète l'insuffisance des niveaux de GSH (Garg et al., 2008 ; 2009). L'inhibition de l'activité enzymatique de la GST a été prouvée par plusieurs recherches dans différents organes et tissus chez les animaux d'expérience après exposition au méthomyl (El-Khawaga, 2005 ; Garg et al., 2008 ; 2009 ; 2009a ; Mansour et al., 2009 ; Manawadi et Kaliwal, 2010 ; El-Demerdash et al., 2012 ; El-Khawaga, 2012 ; EL-Demerdash et al., 2013).

Cependant, plusieurs études ont indiqué que les carbamates pesticides inhibent les activités des enzymes antioxydantes et augmentent le niveau du MDA *in vitro* (Mansour et al., 2009 ; Maran et al., 2010 ; El-Demerdash, 2011) et *in vivo* (El-Khawaga, 2005 ; Salama et al., 2005 ; Kamboj et al., 2006 ; Garg et al., 2008 ; Kamboj et al., 2008 ; Gupta et al., 2009 ; Ozden et al., 2009 ; Rai et al., 2009).

En revanche, le traitement des rats recevant le méthomyl par une supplémentation en sélénium et/ou en vitamine C a amélioré l'activité enzymatique de GPx, CAT et GST dans les différents organes ; foie, reins et cerveau et dans les érythrocytes.

Les résultats obtenus par EL-Khawaga (2005) ont montré l'effet protecteur de sélénium sur les enzymes antioxydantes telles que la GST et la CAT contre le méthomyl. Ceci pourrait être couplé à leur capacité de stimuler plusieurs enzymes antioxydantes ou d'empêcher des dommages causés par les RLs (EL-Khawaga, 2005). L'effet bénéfique de sélénium sur l'activité des enzymes antioxydantes est démonté aussi par d'autres recherches obtenues par El-Demerdash (2004), EL-Khawaga (2005) et Messaoud *et al.* (2009).

La vitamine C en tant qu'antioxydant puissant, protège les membranes et les macromolécules contre l'attaque radicalaire et les dommages peroxydatifs. Plusieurs études ont confirmé leur effet protecteur sur l'activité des enzymes antioxydantes (Yousef, 2004 ; Fetoui *et al.*, 2008 ; 2009 ; Rai *et al.*, 2009 ; Aly *et al.*, 2010 ; El-Gendy *et al.*, 2010 ; Fetoui *et al.*, 2010).

Chapitre VI : Impact du méthomyl sur l'activité de l'acétylcholinestérase et de lactate déshydrogénase : Effets protecteurs de la supplémentation en sélénium et/ou en vitamine C

1. Action sur les poids absolu et relatif du cerveau

Nous avons suivi l'évolution des poids absolu (PA) et relatif (PR) du cerveau chez les rats témoins et les rats traités par le méthomyl et les combinaisons méthomyl plus sélénium et/ou vitamine C.

Les résultats obtenus montrent qu'il y a eu une augmentation statistiquement significative du poids relatif du cerveau chez le groupe traité par le méthomyl comparant au groupe témoin, par contre on enregistre un rétablissement par une diminution significative du poids absolu du cerveau chez les rats traités par la combinaison méthomyl plus sélénium et vitamine C et du poids relatif du cerveau chez les rats traités par les combinaisons méthomyl plus sélénium et/ou vitamine C comparant aux rats traités par le méthomyl.

On note aussi une variation statistiquement significative des poids absolu et relatif du cerveau chez les lots recevant la combinaison méthomyl plus sélénium ou vitamine C par rapport au lot recevant la combinaison méthomyl plus sélénium et vitamine C (tableau 14 ; figure 48).

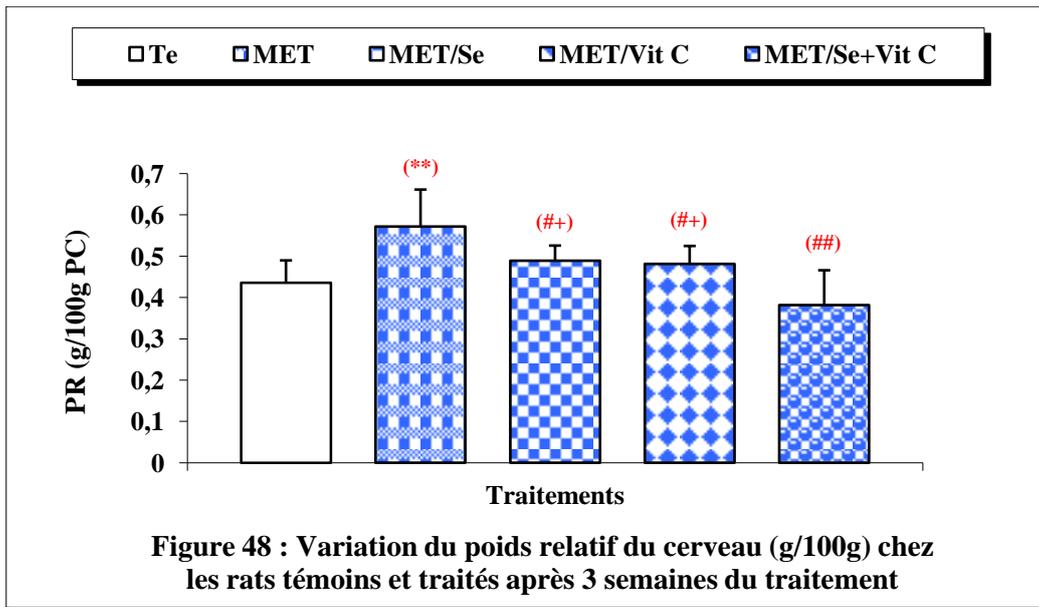
Tab.14 : Variation des poids absolu (g) et relatif (PR) (g/100g de PC) du cerveau chez les rats témoins et traités après 3 semaines du traitement.

Paramètres	Lots expérimentaux				
	Témoin	MET	MET/Se	MET/Vit C	MET/Se+Vit C
PA du cerveau (g)	1.03 ± 0.12	1.19 ± 0.16	1.07 ± 0.12 ⁽⁺⁾	1.07 ± 0.08 ⁽⁺⁾	0.88 ± 0.19 ^(#)
%	–	+ 15.34%	+ 3.88%	+ 3.88%	- 14.56%
PR du cerveau (g/100g de PC)	0.436 ± 0.05	0.572 ± 0.09 ^(**)	0.489 ± 0.04 ^(#+)	0.481 ± 0.04 ^(#+)	0.382 ± 0.08 ^(##)
%	–	+ 31.19%	+ 12.15%	+ 10.32%	- 12.38%

** p ≤ 0.01 comparant aux témoins ;

p ≤ 0.05 ; ## p ≤ 0.01 comparant aux traités par MET ;

+ p ≤ 0.05 traités par MET/Se ou Vit C comparant aux traités par MET/Se+Vit C.



** p ≤ 0.01 comparant aux témoins ;

p ≤ 0.05 comparant aux traités par MET ;

+ p ≤ 0.05 traités par MET/Se ou Vit C comparant aux traités par MET/Se+Vit C.

2. Effet sur l'activité de l'acétylcholinestérase au niveau cérébrale et plasmatique

La variation de l'activité de l'acétylcholinestérase (AChE) au niveau cérébrale et plasmatique des rats témoins et traités par le méthomyl et les combinaisons méthomyl plus sélénium et/ou vitamine C après 3 semaines du traitement est montrée sur le tableau 15.

Tab.15 : Variation de l'activité de l'acétylcholinestérase (µmol/min/mg protéine) au niveau cérébrale et plasmatique chez les rats témoins et traités après 3 semaines du traitement.

Paramètres	Organes	Lots expérimentaux				
		Témoins	MET	MET / Se	MET / Vit C	MET / Se+Vit C
AChE (µmol/min/mg prot)	Cerveau	7.57±1.1	4.35±0.26 ^{**}	7.7±0.98 ^{##++}	4.6±0.32 ^(*)	4.62±0.25 ^(*)
	%	-	- 42.54%	+ 1.72%	- 39.23%	- 38.97%
	Plasma	68.5±9.57	28.25±5.44 ^{**}	78.5±11.68 ^{##}	62±8.14 ^(#)	80.25±13.15 ^{##}
	%	-	- 58.76%	+ 14.59%	- 9.49%	+ 17.15%

* p ≤ 0.05 ; ** p ≤ 0.01 comparant aux témoins ;

p ≤ 0.05 ; ## p ≤ 0.01 comparant aux traités par MET ;

++ p ≤ 0.01 traités par MET/Se ou Vit C comparant aux traités par MET/Se+Vit C.

2.1. Activité de l'acétylcholinestérase (AChE)

a - Dans le cerveau

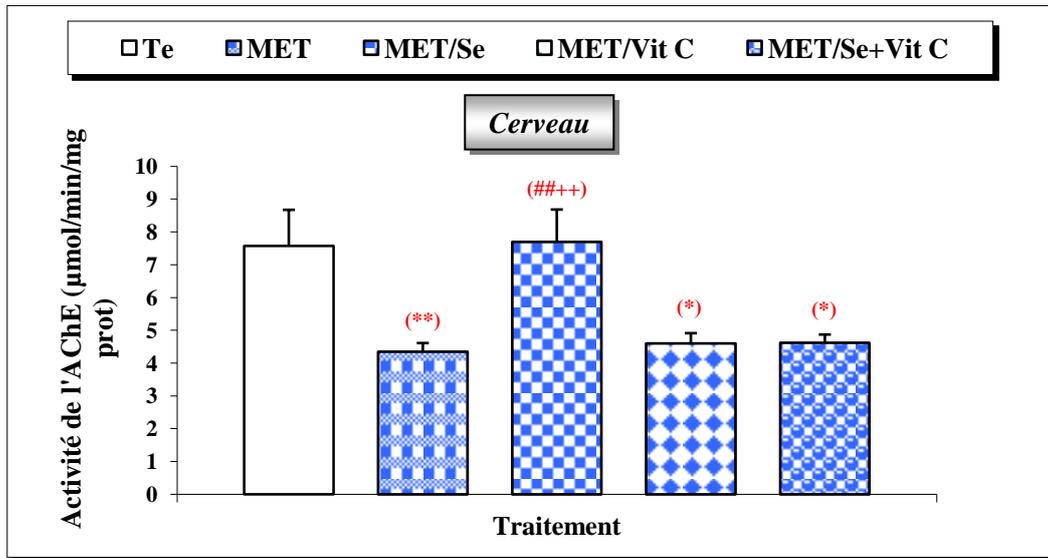
Les résultats obtenus montrent qu'il a eu une diminution significative de l'activité enzymatique de l'acétylcholinestérase (AChE) dans le cerveau des rats traités par le méthomyl comparant au groupe témoin. On note aussi une différence significative de l'activité enzymatique de l'AChE chez les groupes traités par les combinaisons méthomyl plus vitamine C et méthomyl plus sélénium et vitamine C par rapport aux rats témoins.

Par contre, on enregistre un rétablissement par une augmentation statistiquement significative chez le groupe recevant la combinaison méthomyl plus sélénium comparant au groupe recevant le méthomyl.

On enregistre une variation significative chez le lot traité par la combinaison méthomyl plus sélénium par rapport au lot traité par la combinaison méthomyl plus sélénium et vitamine C (tableau 15 ; figure 49).

b - Dans le plasma

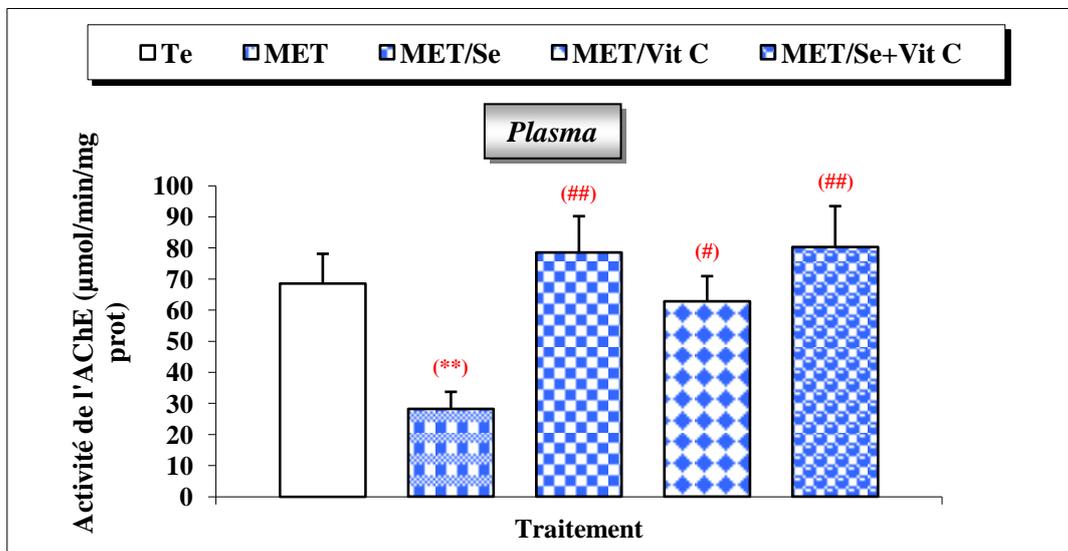
Nos résultats montrent qu'il a eu une diminution significative de l'activité enzymatique de l'acétylcholinestérase (AChE) plasmatique chez le group traité par le méthomyl comparant au groupe témoin. En revanche, on enregistre un rétablissement par une augmentation significative de l'activité de l'AChE chez les rats traités par les combinaisons méthomyl plus sélénium et/ou vitamine C par rapport aux rats traités par le méthomyl (tableau 15 ; figure 49).



* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$ comparant aux témoins ;

$p \leq 0.01$ comparant aux traités par MET ;

+++ $p \leq 0.01$ traités par MET/Se ou Vit C comparant aux traités par MET/Se+Vit C.



** $p \leq 0.01$ comparant aux témoins ;

$p \leq 0.05$; ## $p \leq 0.01$ comparant aux traités par MET.

Fig.49 : Variation de l'activité enzymatique de l'acétylcholinestérase ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protéine) dans le cerveau et le plasma chez les rats témoins et traités pendant 3 semaines du traitement.

3. Effet sur l'activité de lactate déshydrogénase au niveau cérébrale et érythrocytaire

La variation de l'activité de lactate déshydrogénase (LDH) au niveau cérébral et érythrocytaire des rats témoins et traités par le méthomyl et les combinaisons méthomyl / sélénium et/ou vitamine C après 3 semaines du traitement est montrée sur le tableau 16.

Tab.16 : Variation de l'activité de lactate déshydrogénase (U/L) au niveau cérébrale et érythrocytaire chez les rats témoins et traités après 3 semaines du traitement.

Paramètres	Organes	Lots expérimentaux				
		Témoins	MET	MET / Se	MET / Vit C	MET / Se+Vit C
LDH (U/L)	Cerveau	158.46±11.41	220.39±15.51 ^(*)	160.06±15.88 ^(#)	174.83±16.14 ^(#)	162.52±16.06 ^(#)
	%	—	+ 39.08%	+ 1.01%	+ 10.33%	+ 2.56%
	Erythrocytes	35.83±1.83	45.19±0.35 ^(**)	36.57±1.69 ^(##)	36.07±1.52 ^(##)	35.34±1.84 ^(##)
	%	—	+ 26.12%	+ 2.06%	- 20.18%	- 1.37%

* p ≤0.05 ; ** p ≤0.01 comparant aux témoins ;

p ≤0.05 ; ## p ≤0.01 comparant aux traités par MET.

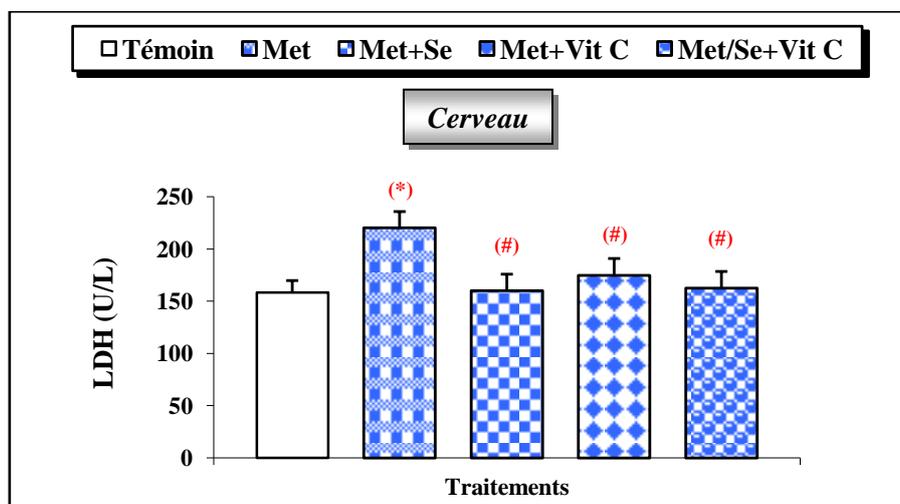
3.1. Activité de lactate déshydrogénase (LDH)

a - Dans le cerveau

Les résultats obtenus montrent qu'il a eu une augmentation significative de l'activité enzymatique de lactate déshydrogénase (LDH) dans le cerveau chez le groupe traité par le méthomyl comparant au groupe témoin, par contre on enregistre un rétablissement par une diminution significative de leur activité chez les lots traités par les combinaisons méthomyl plus sélénium et/ou vitamine C par rapport au lot traité par le méthomyl (tableau 16 ; figure 50).

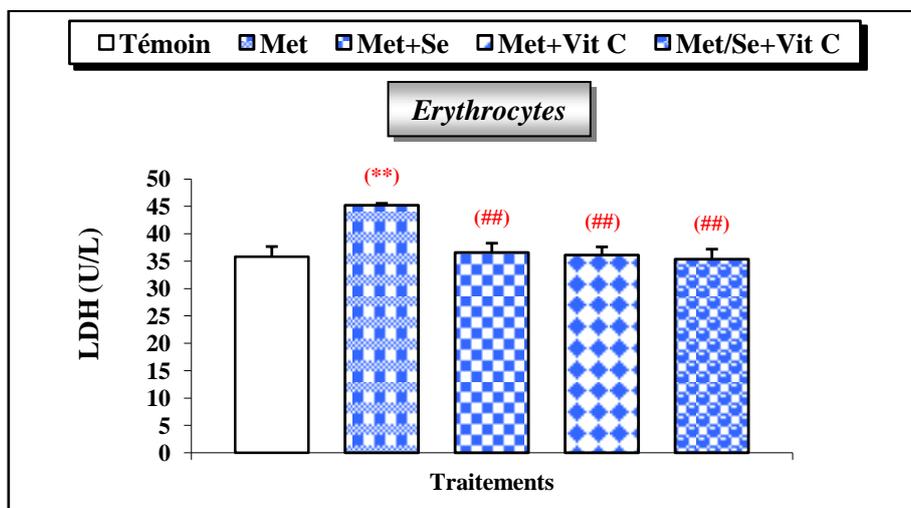
b - Dans les érythrocytes

Le traitement des rats par le méthomyl provoque une augmentation significative de l'activité enzymatique de lactate déshydrogénase (LDH) dans les érythrocytes comparant aux rats témoins, par contre on enregistre un rétablissement par une diminution significative de leur activité chez les groupes recevant les combinaisons méthomyl plus sélénium et/ou vitamine C par rapport au groupe traité par le méthomyl (tableau 16 ; figure 50).



* $p \leq 0.05$ comparant aux témoins ;

$p \leq 0.05$ comparant aux traités par MET.



** $p \leq 0.01$ comparant aux témoins ;

$p \leq 0.01$ comparant aux traités par MET.

Fig.50 : Variation de l'activité enzymatique de lactate déshydrogénase (U/L) dans le cerveau et les érythrocytes chez les rats témoins et traités pendant 3 semaines du traitement.

❖ Discussion

L'exposition des organismes cibles (ravageurs) et non cibles (mammifères) aux pesticides affecte le système nerveux en inhibant l'activité de l'acétylcholinestérase (AChE). En effet, l'inhibition de l'AChE par de nombreux toxiques entraîne une accumulation du médiateur chimique dans les espaces synaptiques, conduit ainsi à une transmission continue de l'influx.

Concernant l'activité de l'AChE ; biomarqueur de la neurotoxicité, les résultats obtenus indiquent leur diminution dans le cerveau et le plasma des rats après traitement avec le méthomyl. Comme les autres insecticides carbamates, le méthomyl exerce leur toxicité par l'inhibition de l'AChE dans les synapses et les jonctions neuromusculaires. Cette inhibition de l'activité de l'AChE, comme cible enzymatique, peut servir d'indicateur d'exposition excessive à ces agents (Brkiæ et *al.*, 2008 ; Derbalah, 2009).

En effet, l'AChE est une enzyme non-thiol-dépendante. Cette enzyme sanguine est biochimiquement identique à celle neuronale. Plusieurs études ont montré la corrélation entre l'inhibition de l'AChE dans le sang et leur inhibition dans les tissus cibles (Yang et Dettbarn, 1996 ; Kale et *al.*, 1999). Sa localisation sur la surface de la membrane érythrocytaire la rend aisément accessible aux radicaux (HO^\bullet), formés dans le milieu externe, qui peut provoquer des changements structurels menant à la diminution de son activité. Les changements dans leur activité peuvent résulter de la réaction directe du xénobiotique avec l'enzyme, à la modification de la membrane érythrocytaire, au changement de la charge électrique de la couche membranaire et à la génération des ERO tels que le H_2O_2 (Mansour et *al.*, 2009).

Plusieurs études ont montré aussi l'effet inhibiteur du méthomyl sur l'activité de l'AChE (Fayez et Bahig, 1991 ; Patil et *al.*, 2008 ; Garg et *al.*, 2009a ; Mansour et *al.*, 2009 ; El-Fakharany et *al.*, 2011).

Par ailleurs, le traitement par le sélénium ou/et la vitamine C a amélioré l'activité enzymatique de l'AChE dans le cerveau et le plasma chez le rat traité par le méthomyl.

Nos résultats montrent aussi une augmentation importante de l'activité enzymatique de lactate déshydrogénase dans le cerveau et les érythrocytes après traitement des rats par le

méthomyl. Cependant, l'augmentation du stress oxydant et de l'oxydation cellulaire provoquée par le traitement au méthomyl, est prouvée par l'élévation de l'activité de LDH dans les tissus. Cette augmentation est probablement un résultat de leur fuite des tissus due au perturbation de la perméabilité membranaire (Bagchi *et al.*, 1995 ; Lohitnavy et Sinhason, 1998 ; Banejee *et al.*, 1999 ; EL-Khawaga, 2005 ; Manawadi et Kaliwal, 2010a) et indique aussi un mécanisme compensatoire par le tissu affecté qui exige une énergie additionnelle pour son entretien (El-Demerdash *et al.*, 2012).

Ces observations sont en bon accord avec d'autres recherches dans plusieurs organes et tissus des animaux d'expérience (Saiyed *et al.*, 1992 ; Gupta *et al.*, 1994 ; Lohitnavy et Sinhason, 1998 ; El-Khawaga, 2005 ; Salama *et al.*, 2005 ; Manawadi et Kaliwal, 2010a ; El-Demerdash *et al.*, 2012 ; El-Khawaga, 2012) suite à l'exposition au méthomyl. D'autres études ont montré aussi l'augmentation de l'activité de LDH dans plusieurs organes après traitement par différents insecticides (Kacker, 1997 ; Fetoui *et al.*, 2008 ; 2009).

En revanche, le traitement par le sélénium ou/et la vitamine C a amélioré l'activité de LDH dans le cerveau et les érythrocytes chez les rats traités par le méthomyl.

En effet, Fetoui *et al.* (2008 ; 2009) ont montré l'effet protecteur de la vitamine C sur l'activité de LDH contre les dommages des organes ; foie et cerveau suite à l'exposition des rats au lambda-cyhalothrine (un pyréthroïde insecticide). Cet effet bénéfique est du à leur propriété de scavenging les ERO et leur effet indirect en tant que régulateur des systèmes antioxydants.



Conclusions générales et perspectives

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

L'objectif de ce travail de recherche est d'explorer le statut du stress oxydant induit par un insecticide carbamate ; le méthomyl chez le rat et de tester les effets protecteurs de la supplémentation en sélénium et/ou en vitamine C.

Les résultats obtenus nous ont permis de tirer les conclusions suivantes :

- L'administration de méthomyl chez les rats, a engendré :

- ❖ Des perturbations au niveau de la croissance générale des rats :
 - ✓ Diminution du poids corporel durant la période de traitement ;
 - ✓ Augmentation des poids absolus et relatifs de certains organes (foie, reins, cerveau et thyroïde).
 - ✓ Variation de la consommation quotidienne d'aliment et de l'eau de boisson.

- ❖ Des perturbations au niveau de certains paramètres métaboliques biomarqueurs de l'activité hépatique :
 - ✓ Augmentation des concentrations plasmatiques en glucose, bilirubine, cholestérol et triglycérides témoignant de l'endommagement du foie ;
 - ✓ Augmentation de l'activité enzymatique des transaminases (ASAT et ALAT), phosphatase alcaline (PAL) et de lactate déshydrogénase (LDH) ;

- ❖ Une perturbation des paramètres plasmatiques de la néphrotoxicité (urée et créatinine) ;

- ❖ Une perturbation de la fonction thyroïdienne (augmentation du taux plasmatique de la thyroxine libre, FT4) ;

- ❖ Modifications des activités enzymatiques d'acétylcholinestérase (AChE) et de lactate déshydrogénase (LDH) cérébrale ;

- ❖ L'exposition continue au méthomyl génère un état de stress oxydant traduit par des perturbations au niveau de certains paramètres biomarqueurs objectivé par :
 - ✓ une forte peroxydation lipidique hépatique, rénale, cérébrale et érythrocytaire engendrant des lésions au niveau des membranes cellulaires ;
 - ✓ une perturbation des activités de quelques antioxydants enzymatiques telles que la GST, la CAT et la GPx et des antioxydants non enzymatiques tels que la GSH.

- La supplémentation en sélénium et/ou vitamine C chez des rats traités au méthomyl, a provoqué :

- ✓ Une amélioration au niveau de la croissance générale des rats ;
- ✓ Une baisse de la peroxydation lipidique hépatique, rénale, cérébrale et érythrocytaire engendrant une protection contre les lésions des membranes cellulaires ;
- ✓ Une amélioration du statut enzymatique antioxydant telles que la GST, la CAT et la GPx et non enzymatique telle que la GSH au niveau hépatique, rénale, cérébrale et érythrocytaire ;
- ✓ Une correction des taux plasmatiques en créatinine et en urée ;
- ✓ Une réduction de l'activité des biomarqueurs de la cytolyse et de l'état inflammatoire (LDH, ASAT et ALAT) ;
- ✓ Une correction des taux plasmatiques en glucose, en bilirubine, en triglycérides et en cholestérol total ;

Ainsi, des supplémentations en sélénium et/ou en vitamine C permettent de limiter les perturbations provoquées par le méthomyl. Ces supplémentations semblent avoir des effets bénéfiques, par une limitation des phénomènes radicalaires et une réparation des dommages oxydantes, ceci est expliqué par leur pouvoir antioxydant qui conduit donc à contracter l'état du stress oxydant.

En perspectives

Il s'avère intéressant d'approfondir *ces conclusions* par :

- ☞ L'exploration de l'effet du méthomyl sur la fonction hématologique ;
- ☞ Déterminer la concentration en méthomyl au niveau des organes cibles notamment dans les organes de détoxification ;
- ☞ Etudier les mécanismes cellulaire et moléculaire des effets protecteurs de Se et de la vitamine C contre la cytotoxicité induite par le méthomyl ;
- ☞ L'exploration des métallothionéines ainsi que les protéines stress : les heat shock proteins (HSP) ;
- ☞ Etudier enfin, l'effet protecteur des antioxydants naturels contre la toxicité induite par le méthomyl chez le rat ou d'autres modèles expérimentaux.



Références bibliographiques

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

- Abdollahi M., Ranjbar A., Shadnia S., Nikfar S., Rezaiee A. (2004).** Pesticides and oxidative stress: a review. *Med. Sci. Monit.* **10**: RA141-RA147.
- Aebi H. (1984).** Catalase *in vitro*. *Methods in Enzymology.* **105**: 121-126.
- Agrawal A., Sharma B. (2010).** Pesticides induced oxidative stress in mammalian systems. *Int. J. Biol. Med. Res.* **1(3)**: 90-104.
- Ahmad I., Shukla S., Kumar A., Singh B.K., Patel D.K., Pandey H.P., Singh C. (2010).** Maneb and paraquat-induced modulation of toxicant responsive genes in the rat liver: comparison with polymorphonuclear leukocytes. *Chem. Biol. Interact.* **188**: 566-579.
- Ahmed M.M., Sahar L., Nasit F., Minhas R. (2000).** Pesticides induce changes in Secretory Activity of the Thyroid Gland in Rats. *Pakistan J. Zool.* **32**: 333-336.
- Al-Amoudi W.M. (2012).** Protective Effect of Vitamin C against Carbofuran-Induced Testicular Toxicity in Albino Mice. *Journal of American Science.* **8(1)**: 335-341.
- Almasiova V., Holovska K., Tarabova L., Cigankova V., Lukacinova A., Nistiar F. (2012).** Structural and ultrastructural study of the rabbit testes exposed to carbamate insecticide. *Journal of Environmental Science and Health, Part A: Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering.* **47(9)**: 1319-1328.
- Al-Shinnawy M.S. (2008).** Assessment of the changes in some diagnostic parameters in male albino rats (*Rattus norvegicus*) toxicated with thiodicarb insecticide. *Egypt. Acad. J. Biol. Sci.* **1(2)**: 157-166.
- Al-Shinnawy M.S. (2008a).** Vitamin C as ameliorative agent against thiodicarb toxicated male albino rats (*Rattus norvegicus*). *Egypt. Acad. J. Biol. Sci.* **1(2)**: 177-187.
- Aly N., El-Gendy K., Mahmoud F., El-Sebae A.K. (2010).** Protective effect of vitamin C against chlorpyrifos oxidative stress in male mice. *Pesticide Biochemistry and Physiology.* **97**: 7-12.
- Arrigoni O., De Tullio M.C. (2002).** Ascorbic acid: much more than just an antioxidant. *Biochimica et Biophysica Acta.* **1569**: 1-9.

B

Bagchi D., Bagchi M., Hassoun E.A., Stohs S.J. (1995). In vitro and in vivo generation of reactive oxygen species, DNA damage and lactate dehydrogenase leakage by selected pesticides. *Toxicol.* **104**: 129-140.

Baillie J.K., Bates MGD., Thompson AAR., Waring WS., Partridge RW., Schnopp MF., Simpson A., Gulliver-Sloan F., Maxwell SRJ., Webb DJ. (2007). Lowland Subjects Exposed to High Altitude Plasma Antioxidant Capacity in Healthy Endogenous Urate Production Augments. *Chest.* **131**: 1473-1478.

Ball G.F.M. (2004). Vitamins: Their role in the human body. Blackwell Publishing, Oxford. 449p.

Baligar P.N., Kaliwal B.B. (2002). Reproductive toxicity of carbofuran to the female mice: effects on estrous cycle and follicles. *Ind. Health.* **40**: 345-352.

Banerjee B.D., Seth V., Bhattacharya A., Pasha S.T., Chakraborty A.K. (1999). Biochemical effects of some pesticides on lipid peroxidation and free radical scavengers. *Toxicology Letters.* **107**: 33-47.

Baron R.L. (1991). Carbamate insecticides. In: Hayes W.J., Laws E.R. (Eds.). Handbook of pesticide toxicology. 3th Volume. Academic Press, New York. 1125-1189.

Bashandy S.A., AlWasel S.H. (2011). Carbon Tetrachloride-induced Hepatotoxicity and Nephrotoxicity in Rats: Protective Role of Vitamin C. *Journal of Pharmacology and Toxicology.* **6(3)**: 283-292.

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

Ben Amara I., Soudani N., Troudi A., Bouaziz H., Boudawara T., Zeghal N. (2011). Antioxidant effect of vitamin E and selenium on hepatotoxicity induced by dimethoate in female adult rats. *Ecotoxicology and Environmental Safety.* **74**: 811-819.

Ben Amara I., Troudi A., Garoui E.M., Hakim A., Boudawara T., Zeghal K.M., Zeghal N. (2011a). Protective effects of selenium on methimazole nephrotoxicity in adult rats and their offspring. *Experimental and Toxicologic Pathology.* **63**: 553-561.

Bendich A. (1990). Antioxidant micronutrients and immune responses. In: Bendich A., Chandra R.K. (Eds.). Micronutrients and Immune Functions. New York Academy of Sciences, New York. 175.

- Berkson B.M. (1999).** A conservative triple antioxidant approach to the treatment of hepatitis C. Combination of lipoic acid (thioctic acid) silymarin, and selenium, three case histories. *Med. Klin.* **94S3**: 84-89.
- Bloomer R.J., Goldfarb A.H., McKenzie M.J., You T., Nguyen L. (2004).** Effects of antioxidant therapy in women exposed to eccentric exercise. *Int. J. Sport Nutr. Exerc. Metab.* **14(4)**: 377-88.
- Bonatti S., Bolognesi C., Degan P., Abbondandolo A. (1994).** Genotoxic effects of the carbamate insecticide methomyl. I. In vitro studies with pure compound and the technical formulation "Lannate 25". *Environ. Molecular Mutagenesis.* **23**: 306-311.
- Bonnefont-Rousselot D., Thérond P., Beaudeau JL., Peynet J., Legrand A., Delattre J. (2001).** Aging and oxidative stress. Which potential markers? *Ann. Biol. Clin.* **59(4)**: 453-459.
- Bonnefont-Rousselot D., Thérond P., Delattre J. (2003).** Radicaux libres et antioxydants. En : Delattre J., Durand G., Jardillier J-C. Biochimie pathologique. Flammarion, Paris. 317p.
- Bourgeois C. (2003).** Les vitamines dans les industries agroalimentaires. Editions TEC & DOC, Paris. 708p.
- Bowrey D.J., Morris-Stiff G.J., Puntis M.C. (1999).** Selenium deficiency and chronic pancreatitis disease and potential for therapy. *HPB-Surg.* **11**: 207-216.
- Bradford M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantities of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein binding. *Analytical Biochemistry.* **7**: 248-254.
- Brenneisen P., Steinbrenner H., Sies H. (2005).** Selenium, oxidative stress, and health aspects. *Molecular Aspects of Medicine.* **26(4-5)**: 256-267.
- Brkić V.D., Vitorović S.L., Gašić S.M., Nešković N.K. (2008).** Carbofuran in water: Subchronic toxicity to rats. *Environmental Toxicology and Pharmacology.* **25**: 334-341.
- Brown K.M., Arthur J.R. (2001).** Selenium, selenoproteins and human health: a review. *Public Health Nutr.* **4**: 593-599.
- Buege J.A., Aust S.D. (1972).** Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology.* **51**: 302-310.
- Bulger E.M., Maier V.R. (2001).** Antioxidants in critical illness. *Arch. Surg.* **136**: 1201-1206.
- Burk R.F. (1994).** Selenium in biology and human health. Springer-Verlag, New York. 221p.
- Burtis, A et al. (1999).** Tiets textbook of clinical chemistry. 3rd Ed AACC.

C

- Cadet J., Bellon S., Berger M., Bourdat A.G., Douki T., Duarte V., Frelon S., Gasparutto D., Ravanat J.L., Sauvaigo S. (2002).** Recent aspects of oxidative DNA damage: guanine lesions, measurement and substrate specificity of DNA repair glycosylases. *Biol. Chem.* **383(6)**: 933-943.
- Cai H., Harrison D.G. (2000).** Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ. Res.* **87(10)**: 840-844.
- Carr A.C., Frei B. (1999).** Toward a new recommended dietary allowance for Vitamin C based on antioxidant and health effects in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* **69(6)**: 1086-1107.
- Cemek M., Büyükben A., Büyükkokuroğlu M.E., Aymelek F., Tür L. (2010).** Protective roles of vitamin E (α -tocopherol), selenium and vitamin E plus selenium in organophosphate toxicity in vivo: A comparative study. *Pesticide Biochemistry and Physiology.* **96**: 113-118.
- Chan S., Gerson B., Subramanian S. (1998).** The role of copper, molybdenum, selenium and zinc in nutrition and health. *Clin. Lab. Med.* **18**: 673-685.
- Chattopadhyay S., Sampa Pal G., Ghosh D., Debnath J. (2003).** Effect of dietary coadministration of sodium selenite on sodium arsenite-induced ovarian and uterine disorders in mature albino rats. *Toxicological Science.* **75**: 412-422.
- Choudhary, N., Sharma, M., Verma P., Joshi S.C. (2003).** Hepato and nephrotoxicity in rat exposed to endosulfan. *J. Environ. Biol.* **24**: 305-308.
- Clarkson P.M., Thompson H.S. (2000).** Antioxidants: what role do they play in physical activity and health? *American Journal of Clinical Nutrition.* **72(2)**: 637-646.
- Clermont G., Lecour S., Cabanne J.F., Motte G., Guillard J.C., Chevet D., Rochette L. (2001).** Vitamin E-coated dialyzer reduces oxidative stress in haemodialysis patients. *Free Radic. Biol. Med.* **31**: 233-241.
- Clive T. (2001).** Methomyl. In: Tomlin C.D.S. The pesticide manual. British Crop Protection Council, Surrey, UK. 60-21.
- Comhair S.A.A., Erzurum S.C. (2002).** Antioxidant responses to oxidant-mediated lung diseases. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **283(2)**: 246-255.
- Cotonat J. (1996).** La toxicologie. Presses universitaires de France, Paris. 127p.
- Couteux A., Salaün C. (2009).** Index phytosanitaire ACTA 2009. 45^{ème} édition. Association de Coordination Technique Agricole. MAME.
- CPP. (2002).** Risques sanitaires liés à l'utilisation des produits phytosanitaires. *Comité de la Prévention et de la Protection.* 47p.

Crapo JD. (1997). Mouse extracellular superoxide dismutase: primary structure, tissue specific gene expression, chromosomal localization, and lung in situ hybridization. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* **17**: 393-403.

D

Das K., Chainy G.B.N. (2001). Modulation of liver mitochondrial antioxidant defence system by thyroid hormone. *Biochem. Biophys. Acta.* **1573**: 1-13.

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

De Moffarts B., Kirschvink N., Pincemail J., Lekeux P. (2005). Impact physiologique et pathologique du stress oxydant chez le cheval. **149**: 1-9.

De Moffarts B., Portier K., Kirschvink N., Coudert J., Fellmann N., van Erck E., Letellier C., Motta C., Pincemail J., Art T., Lekeux P. (2007). Effects of exercise and oral antioxidant supplementation enriched in (ω -3) fatty acids on blood oxidant markers and erythrocyte membrane fluidity in horses. *Vet. J.* **174(1)**: 113-121.

Derbalah A.S. (2009). Chemical remediation of carbofuran insecticide in aquatic system by advanced oxidation processes. *J. Agric. Res. Kafir El-Sheikh Univ.* **35**: 308-327.

Dias E., Gomes M., Domingues C., Ramalheira E., Morais S., Pereira M.L. (2013). Subacute Effects of the Thiodicarb Pesticide on Target Organs of Male Wistar Rats: Biochemical, Histological, and Flow Cytometry Studies. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A: Current Issues.* **76(9)**: 533-539.

Dikalov S., Griendling K.K., Harrison D.G. (2007). Measurement of reactive oxygen species in cardiovascular studies. *Hypertension.* **49(4)**: 717-727.

Dodig S., Cepelak I. (2004). The facts and controversies about selenium. *Acta pharmaceutica.* **54**: 261-276.

Douris PC., Elokda AS., Handrakis JP., Principal S., Rondo E., Bovell J., Coughlin WP., Mastroianni CN., Wong MJ., Zimmerman T. (2009). Martial art training enhances the glutathione antioxidant system in middle-aged adults. *J. Strength Cond. Res.* **23(5)**: 1518-23.

Driskell W.J., Groce D.F., Hill R.H. (1991). Methomyl in the blood of a pilot who crashed during aerial spraying. *J. Anal. Toxicol.* **15**: 339-340.

Duarte T.L., Jones G.D.D. (2007). Vitamin C modulation of H₂O₂-induced damage and iron homeostasis in human cells. *Free Radical Biology and Medicine.* **43**: 1165-1175.

Duarte T.L., Cooke M.S., Jones G.D.D. (2009). Gene expression profiling reveals new protective roles for vitamin C in human skin cells. *Free Radical Biology and Medicine*. **46**: 78-87.

Ducros V., Favier A. (2004). Métabolisme du sélénium. *EMC-Endocrinologie*. **1**: 19-28.

E

Ecobichon D.J. (2001). Carbamate Insecticides. In: Krieger R., Doull J., Ecobichon D.J., Gammon D., Hodgson E., Reiter L., Ross J. (Eds.). *Handbook of Pesticide Toxicology*. 2nd edition. Academic Press, New York. 1087-1107.

EFSA (European Food Safety Authority). (2008). Conclusion on Pesticide Peer Review Regarding the Risk Assessment of the Active Substance Methomyl. EFSA Scientific Report 222. 1-99.

El-Demerdash F.M. (2004). Antioxidant effect of vitamin E and selenium on lipid peroxidation, enzyme activities and biochemical parameters in rats exposed to aluminium. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. **18**: 113-121.

El-Demerdash F.M., Yousef M.I., Kedwany F.S., Baghdadi H.H. (2004). Role of α -tocopherol and b-carotene in ameliorating the fenvalerate-induced changes in oxidative stress, hemato-biochemical parameters and semen quality of male rats. *Journal of Environmental Science and Health*. **B39**: 443-459.

El-Demerdash F.M. (2011). Lipid peroxidation, oxidative stress and acetylcholinesterase in rat brain exposed to organophosphate and pyrethroid insecticides. *Food and Chemical Toxicology*. **49(6)**: 1346-1352.

El-Demerdash F.M., Attia A.A., Elmazoudy R.H. (2012). Biochemical and histopathological changes induced by different time intervals of methomyl treatment in mice liver. *Journal of Environmental Science and Health, Part A: Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*. **47(12)**: 1948-1954.

El-Demerdash F.M., Dewer Y., Elmazoudy R.H., Attia A.A. (2013). Kidney antioxidant status, biochemical parameters and histopathological changes induced by methomyl in CD-1 mice. *Experimental and Toxicologic Pathology*. **65**: 897-901.

El-Demerdash F.M., Nasr H.M. (2014). Antioxidant effect of selenium on lipid peroxidation, hyperlipidemia and biochemical parameters in rats exposed to diazinon. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. **28**: 89-93.

- El-Fakharany I.I., Massoud A.H., Derbalah A.S., Saad Allah M.S. (2011).** Toxicological effects of methomyl and remediation technologies of its residues in an aquatic system. *Journal of Environmental Chemistry and Ecotoxicology*. **3(13)**: 332-339.
- El-Gendy K.S., Aly N.M., Mahmoud F.H., Kenawy A., El-Sebae A.K. (2010).** The role of vitamin C as antioxidant in protection of oxidative stress induced by imidacloprid. *Food Chem. Toxicol.* **48**: 215-221.
- El-Khawaga O.Y. (2005).** Role of selenium on antioxidant capacity in methomyl-treated mice. *J. Physiol. Biochem.* **61(4)**: 501-506.
- El-Khawaga O.Y. (2012).** Protective effects of tannic acid against methomyl-induced oxidative stress. *J. Biotechnol. Biomaterial.* **2(2)**: 127. doi:10.4172/2155-952X.1000127.
- Ellman G.L. (1959).** Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **82**: 70-77.
- Ellman G.L., Courtney K.D., ANDRES V., Featherstone R.M. (1961).** A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*. **7**: 88-95.
- El Missiry M.A., Othman A.I. (1993).** Influence of lannate on biochemical and hematological parameters in old rats. *J. Egypt. Ger. Soc. Zool.* **11(A)**: 219-229.
- El-Zahar H.E., Tharwat E., El-Aal W.A., El-Ashry M.A., Saad M.M., Amin S.O. (1996).** Rabbit and aflatoxins. 1. Effect of aflatoxins. 2. Reproductive performance of mature New Zealand white rabbit bucks. *Egypt. J. Rabbit Sci.* **6**: 55-65.
- Eraslan G., Kanbur M., Silici S. (2009).** Effect of carbaryl on some biochemical changes in rats: The ameliorative effect of bee pollen. *Food and Chemical Toxicology*. **47**: 86-91.
- Ernster L., Forsmark-Andree P. (1993).** Ubiquinol: an endogenous antioxidant in aerobic organisms. *Clin. Investig.* **71**: 60-65.
- Esterbauer H., Gebicki J., Puhl H., Jurgens G. (1992).** The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Rad. Biol. Med.* **13**: 341-349.
- Evans P.H. (1993).** Free radicals in brain metabolism and pathology. *Br. Med. Bull.* **49**: 577-587.

F

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

- Farré M., Fernandez J., Paez M., Granada L., Barba L., Gutierrez H. M., Pulgarin C., Barceló D. (2002).** Analysis and toxicity of methomyl and ametryn after biodegradation. *Anal. Bioanal. Chem.* **373**: 704-709.
- Favier A. (1997).** Le stress oxydant : intérêt de sa mise en évidence en biologie médicale et problèmes posés par le choix d'un marqueur. *Ann. Bio. 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.
- Fayez V., Bahig M. (1991).** Short term toxicity of methomyl in rats. *Chemosphere.* **23(3)**: 375-381.
- Feig D.I., Mazzali M., Kang D.H., Nakagawa T., Price K., Kannelis J., et al. (2006).** Serum uric acid: a risk factor and a target for treatment? *Journal of the American Society of Nephrology.* **17**: S 69-73.
- Fernandez V., Videla L.A. (1989).** Thyroid hormone, active oxygen, and lipid peroxidation, in: J. Miquel, A.T. Quintanilha, H. Weber (Eds.), *Handbook of Free Radicals and Antioxidants in Biomedicine*, CRC Press Inc., Boca Raton, FL. 105-115.
- Fernandez V., Tapia G., Varela P., Romanque P., Cartier-Ugarte D., Videla L.A. (2006).** Thyroid hormone-induced oxidative stress in rodents and humans: A comparative view and relation to redox regulation of gene expression. *Comp. Biochem. Physiol. Part C.* **142(3-4)**: 231-239.
- Fetoui H., Garoui E.M., Makni-ayadi F., Zeghal N. (2008).** Oxidative stress induced by lambda-cyhalothrin (LTC) in rat erythrocytes and brain: attenuation by vitamin C. *Environmental Toxicology and Pharmacology.* **26**: 225-231.
- Fetoui H., Garoui E.M., Zeghal N. (2009).** Lambda-cyhalothrin-induced biochemical and histopathological changes in the liver of rats: Ameliorative effect of ascorbic acid. *Experimental and Toxicologic Pathology.* **6**: 189-196.
- Fetoui H., Makni M., Garoui E.M., Zeghal N. (2010).** Toxic effects of lambda-cyhalothrin, a synthetic pyrethroids pesticide, on the rat kidney: involvement of oxidative stress and protective role of ascorbic acid. *Experimental and Toxicologic Pathology.* **62**: 593-599.
- Fillatre Y. (2011).** Produits phytosanitaires : Développement d'une méthode d'analyse multi-résidus dans les huiles essentielles par couplage de la chromatographie liquide avec la spectrométrie de masse en mode tandem. Thèse de doctorat, spécialité chimie analytique. Université ANGERS, Ecole doctorale : Matières, molécules, matériaux des pays de Loire. 267p.

Finaud J., Lac G., Filaire E. (2006). Oxidative Stress. Relationship with Exercise and Training. *Sports med.* **36(4)**: 327-358.

Fingo D.R. (1997). Kidney function. In: Kaneko J.J., Harvey J.W., Bruce M.L. clinical Biochemistry Domestic Animals. Academic Press, San Diego, California. 462-478.

Flohe L., Gunzler W.A. (1984). Analysis of glutathione peroxidase. *Methods in Enzymology.* **105**: 114-121.

Fukuto R.T. (1990). Mechanism of action of organophosphorus and carbamate insecticides. *Environmental Health Perspectives.* **87**: 245-254.

G

Gammelgaard B., Gabel-Jensen C., Stürup S., Hansen HR. (2008). Complementary use of molecular and element-specific mass spectrometry for identification of selenium compounds related to human selenium metabolism. *Anal. Bioanal. Chem.* **390**: 1691-1706.

Garg D.P., Kiran R., Bansal A.N., Malhotra A. and Dhawan D.K. (2008). Role of vitamin E in mitigating methomyl acute toxicity in blood of male Wistar rats. *Drug and Chemical Toxicology.* **31**: 487-499.

Garg D.P., Bansal A.K., Malhotra A., Kiran R., Dhawan D.K. (2009). Methomyl induced hematological and biochemical alterations protection by vitamin E. *Pesticide Biochemistry and Physiology.* **93(3)**: 127-132.

Garg D.P., Bhalla P., Kiran R., Bansal A.K., Dhawan D.K. (2009a). Vitamin E-mediated protection in methomyl induced alterations in rat liver. *Toxicological and Environmental Chemistry.* **91(4)**: 685-698.

Gbadegesin M.A., Owumi S.E., Akinseye V., Odunola O.A. (2014). Evaluation of hepatotoxicity and clastogenicity of carbofuran in male Wistar rats. *Food and Chemical Toxicology.* **65**: 115-119.

Goto M., Ueda K., Hashimoto T., Fujiwara S., Matsuyama K., Kometani T., Kanazawa K. (2008). A formation mechanism for 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine mediated by peroxidized 2'-déoxythymidine. *Free Radical Biology and Medicine.* **45**: 1318-1325.

Goudable J., Favier A. (1997). Radicaux libres oxygénés et antioxydants. *Nutr. Clin. Metabol.* **11**: 115-120.

Gosselin R.E., Smith R.P., Hodge H.C. (1984). Clinical toxicology of commercial products. 5th edition. Williams and Wilkins, Baltimore, MD.

Grandjean D. (2005). Comprendre le stress oxydatif cellulaire chez le chien. *Le Nouv. Prat. Vét.* **22**: 11-15.

Grashorn M. (2006). Poultry meat as functional food: enrichment with conjugated linoleic acid, omega-3 fatty acids and selenium and impact on meat quality. *Fleischwirtschaft*. **86(2)**: 100-103.

Guanggang X., Diqui L., Jianzhong Y., Jingmin G., Huifeng Z., Mingan S., Liming T. (2013). Carbamate insecticide methomyl confers cytotoxicity through DNA damage induction. *Food and Chemical Toxicology*. **53**: 352-358.

Gupta R.C., Goad J.T., Kadel W.L. (1993). Protection and reversal by memantine and atropine of carbofuran-induced changes in biomarkers. *Drug Develop. Res.* **28**: 153-160.

Gupta R.C., Goad J.T., Kadel W.L. (1994). Energy related metabolic alterations in diaphragm muscle resulting from acute methomyl toxicity. *Neurotoxicology*. **15**: 321-330.

Gupta S., Garg G.R., Bharal N., Mediratta P.K., Banerjee B.D., Sharma K.K. (2009). Reversal of propoxur-induced impairment of step-down passive avoidance, transfer latency and oxidative stress by piracetam and ascorbic acid in rats. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. **28**: 403-408.

Gutteridge J.M., Halliwell B. (2000). Free radicals and antioxidants in the year 2000: a historical look to the future. *Ann. NY Acad.* **899**: 136-147.

H

Habig W.H., Pabst M.J., Jakoby W.B. (1974). Glutathione-S-transferase the first step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry*. **249**: 7130-7139.

Halliwell B. (1990). How to characterize a biological antioxidant. *Free Radic. Res. Commun.* **13**: 1-32.

Halliwell B., Gutteridge J.M.C. (1989). Free radicals in biology and medicine. 2nd edition. Clarendon Press, Oxford. 543p.

Halliwell B., Gutteridge J.M.C. (2007). Free Radicals in Biology and Medicine. 4th edition. Oxford University Press, USA. 704p.

Hamdy H.S. (1993). Effect of gamma irradiation a brain LDH isozymes. *J. Egypt. Ger. Soc. Zool.* **12(A)**: 53-67.

Hassanin M.S. (2011). Potential Impact of Zinc on Hazardous Effect of Pesticides in Male Rats. *Journal of American Science*. **7(7)**: 723-732.

Hassoun E.A., Stohs S.J. (1995). Comparative studies on oxidative stress as a mechanism for the fetotoxicity of TCDD, endrin and lindane in C57BL/6J and DBA/2J mice. *Teratol.* **51**: 186.

Hellsten Y., Svensson M., Sjödin B., Smith S., Christensen A., Richter EA., Bangsbo J. (2001). Allantoin formation and urate and glutathione exchange in human muscle during submaximal exercise. *Free Radic. Biol. Med.* **31(11)**: 1313-1322.

Hemila H., Douglas R.M. (1999). Vitamin C and acute respiratory infection. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* **3**: 756-761.

Hernandez A.F., Lacasana M., Gil F., Rodriguez-Barranco M., Pla A., Lopez-Guarnido O. (2013). Evaluation of pesticide-induced oxidative stress from a gene-environment interaction perspective. *Toxicology.* **307**: 95-102.

Hfaiedh N., Murat J.-C., Elfeki A. (2011). Protective effects of garlic (*Allium sativum*) extract upon lindane-induced oxidative stress and related damages in testes and brain of male rats. *Pesticide Biochemistry and Physiology.* **100**: 187-192.

Houlot R. (1984). Techniques d'histopathologie et de cytopathologie. *Ed. Maloine.* 19-21, 225-227.

Huimin J., Guoan H., Baoqui L., Huafang G., Younong Y., Shuai S. (1994). Antagonism of zinc and selenium to cadmium-induced lipid peroxidation in rats. *Shandong Yike Daxue Xuebao.* **32**: 127.

Hussein H.K., Elnaggar M.H., Al-Dailamy J.M. (2012). Protective role of Vitamin C against hepatorenal toxicity of fenvalerate in male rats. *Global Advanced Research Journal of Environmental Science and Toxicology.* **1(4)**: 060-065.

J

IPCS (International Programme on Chemical Safety). (1996). Methomyl-Environmental Health Criteria 178. World Health Organization, Geneva, Switzerland. 150p.

Iqbal K., Khan A., Ali Khan Khattak M. (2004). Biological Significance of Ascorbic Acid (Vitamin C) in Human Health. *Pakistan Journal of Nutrition.* **3(1)**: 5-13.

Izquierdo-Vega J.A., Soto C.A., Sanchez-Pena L.C., Vizcaya-Ruiz A.D., Del Razo L.M. (2006). Diabetogenic effects and pancreatic oxidative damage in rats subchronically exposed to arsenite. *Toxicology Letters.* **160**: 135-142.

J

Jacob RA. (1999). Vitamin C. In: Shils ME., Olson JA., Shike M., Ross AC. (eds). *Modern Nutrition in Health and Disease.* 9th edition. Williams & Wilkins, Baltimore, MD. 467-483.

Johnston C.S., Steinberg F.M., Rucker R.B. (2001). Ascorbic acid. In: Rucker R.B., Suttie J.W., McCormick D.B., Machlin L.J. (eds). Handbook of vitamins. 3rd edition. Marcel Dekker, Inc, New York. 616p.

Joshi D., Mittal D.K., Shukla S., Srivastav A.K., Srivastav S.K. (2014). N-acetyl cysteine and selenium protects mercuric chloride-induced oxidative stress and antioxidant defense system in liver and kidney of rats: A histopathological approach. *J. Trace Elem. Med. Biol.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtemb.2013.12.006>.

K

Kacker R., Srivastara M.K., Raizada R.B. (1997). Induction of gonadal toxicity to male rats after chronic exposure to mancozob. *Ind. Health.* **35**: 104-111.

Kale M., Rathore N., John S., Bhatnagar D. (1999). Lipid peroxidative damage on pyrethroids exposure and alterations in antioxidant status in rat erythrocytes: a possible involvement of reactive oxygen species. *Toxicology Letters.* **105**: 197-205.

Kale M.K., Umathe S.N., Bhusari K.P. (2006). Oxidative Stress and the Thyroid. *Positive Health.* 24-27.

Kalender S., Kalender Y., Durak D., Ogutcu A., Uzunhisarcikli M., Cevrimli B.S., Yildirim M. (2007). Methyl parathion induced nephrotoxicity in male rats and protective role of vitamins C and E. *Pesticide Biochemistry and Physiology.* **88**: 213-218.

Kalender S., Uzun F.G., Durak D., Demir F., Kalender Y. (2010). Malathion-induced hepatotoxicity in rats: The effects of vitamins C and E. *Food and Chemical Toxicology.* **48**: 633-638.

Kamboj A., Kiran R., Sandhir R. (2006). Carbofuran-induced neurochemical and neurobehavioral alterations in rats: attenuation by N-acetylcysteine. *Experimental Brain Research.* **170**: 367-575.

Kamboj S.S., Kumar V., Kamboj A., Sandhir R. (2008). Mitochondrial oxidative stress and dysfunction in rat brain induced by carbofuran exposure. *Cell. Mol. Neurobiol.* **28**: 961-969.

Kaplan A. (1984). Glucose. Clin. Chem. Toronto. Princeton. 1032-1036.

Kaplan A. (1984). Urea. Clin. Chem. Toronto. Princeton. 1257-1260, 437 and 418.

Kaplan A. et al. (1984). Bilirubin. Clin. Chem. Toronto. Princeton. 1238-1241.

Kaplan A. et al. (1984). Lipids. Clin. Chem. Toronto. Princeton. 918-919.

Kaplan A. et al. (1984). Triglycerides. Clin. Chem. Toronto. Princeton. 437.

- Karami-Mohajeri S., Abdollahi M. (2011).** Toxic influence of organophosphate, carbamate, and organochlorine pesticides on cellular metabolism of lipids, proteins, and carbohydrates: a systematic review. *Human and Experimental Toxicology*. **30(9)**: 1119-1140.
- Kaur M., Sandhir R. (2006).** Comparative effects of acute and chronic carbofuran exposure on oxidative stress and drug-metabolizing enzymes in liver. *Drug Chem. Toxicol.* **29(4)**: 415-421.
- Kehrer JP. (1993).** Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Crit. Rev. Toxicol.* **23**: 21-48.
- Khan D.A., Bhatti M.M., Khan F.A., Naqvi S.T., Karam A. (2008).** Adverse effects of pesticides residues on biochemical markers in Pakistani tobacco farmers. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*. **1**: 274-282.
- Kidd H., James D.R. (1991).** The agrochemicals handbook. 3rd edition. Royal Society of Chemistry Information Services, Cambridge, England.
- Kirschvink N., Moffarts B., Lekeux P. (2008).** The oxidant/antioxidant equilibrium in horses. *The Veter. J.* **177**: 178-191.
- Koller A. (1984).** Total serum protein. Clin. Chem. Toronto. Princeton. 1316-1324.
- Koolman J., Röhm K-H. (2004).** Atlas de Poche de Biochimie. 3^e édition. Flammarion, Paris. 478p.
- Ksheerasagar R.L., Kaliwal B.B. (2006).** Histological and biochemical changes in the liver of albino mice on exposure to insecticide, carbosulfan. *Caspian J. Env. Sci.* **4**: 67-70.
- Kumari B., Madan V.K., Kumar R., Kathpal T.S. (2002).** Monitoring of seasonal vegetables for pesticide residues. *Environ. Monit. Assess.* **74**: 263-270.

ℒ

- Lawler J.M., Demaree S.R. (2001).** Relationship between NADP-specific isocitrate dehydrogenase and glutathione peroxidase in aging rat skeletal muscle. *Mechanisms of Ageing and Development*. **122(3)**: 291-304.
- Letavayova L., Viera Vlckova V., Brozmanov J. (2006).** Selenium: From cancer prevention to DNA damage. *Toxicology*. **227**: 1-14.
- Levine R.L. (2002).** Carbonyl modified proteins in cellular regulation; aging and disease. *Free radic. Biol. Med.* **32**: 790-796.
- Li S., Ming W., Shu-Ting Y., Hui-Li W., Liang C., Li-Guang S., Di-Yun R. (2008).** The interaction of selenium and mercury in the accumulation and oxidative stress of rat tissues. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **70**: 483-489.

Liu Y. (2006). Biliverdin reductase, a major physiologic cytoprotectant, suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis. *Free Radical Biology and Medicine*. **40(6)**: 960-967.

Li Z.H., Zlabek V., Velisek J., Grabic R., Machova J., Randak T. (2010). Modulation of antioxidant defence system in brain of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after chronic carbamazepine treatment. *Comp. Biochem. Physiol.* **C151**: 137-141.

Lohitnavy O., Sinhaseni P. (1998). Increase in lactate dehydrogenase isoenzyme-4 and splenocyte toxicity in methomyl-treated rats. *Arh. Hig. Rada. Toksikol.* **49**: 231-238.

Lyn Patrick ND. (2006). Lead Toxicity Part II: The Role of Free Radical Damage and the Use of Antioxidants in the Pathology and Treatment of Lead Toxicity. *Altern. Med. Rev.* **11(2)**: 114-127.

M

Mac Laren D. (2007). Advances in sports and exercise science series. Nutrition and Sport. 8. Antioxidants and free radicals by Close GL and Mc Ardle F. Elsevier.

Madamanchi NR., Vendrov A., Runge MS. (2005). Oxidative stress and vascular disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **25(1)**: 29-38.

Mahapatra S., Tripathi R.M., Raghunath R., Sadasivan S. (2001). Daily intake of Se by adult population of Mumbai, India. *The Science of the Total Environment*. **277**: 217-233.

Mahgoub A.A., EL-Medany A.H. (2000). Evaluation of subchronic exposure of the male rat's reproductive system to the insecticide methomyl. *Saudi J. Biol. Sci.* **7(2)**: 138-164.

Mahgoub A.A., EL-Medany A.H. (2001). Evaluation of chronic exposure of the male rat reproductive system to the insecticide methomyl. *Pharmacol. Res.* **44(2)**: 73-80.

Makrides C., Koukouvas M., Achillews G., Tsikkos S., Vounou E., Symeonides M., Christodoulides P., Ioannides M. (2005). Methomyl-induced severe acute pancreatitis: possible etiological association. *Journal of Pancreas.* **6(2)**: 166-171.

Manawadi S.I., Kaliwal B.B. (2010). Methomyl-induced alteration in mice hepatic-oxidative status. *Inter. J. Biotech. App.* **2(2)**: 11-19.

Manawadi S.I., Kaliwal B.B. (2010a). Methomyl induced gonadal dysfunction, biochemical contents and enzyme activities in male albino mice. *International Journal of Biotechnology Applications.* **2(2)**: 20-32.

Mansour S.A., Mossa A.T.H., Heikal T.M. (2009). Effects of methomyl on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in rat erythrocytes: *In vitro* studies. *Toxicol. Indust. Health.* **25(8)**: 557-563.

- Maran E., Fernandez M., Barbieri P., Font G., Ruiz M.J. (2009).** Effects of four carbamate compounds on antioxidant parameters. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. **72(3)**: 922-930.
- Maran E., Fernandez-Franzon M., Font G., Ruiz M.J. (2010).** Effects of aldicarb and propoxur on cytotoxicity and lipid peroxidation in CHO-K1 cells. *Food Chem. Toxicol.* **48**: 1592-1596.
- Matos P., Fontainhas-Fernandes A., Peixoto F., Carrola J., Rocha E. (2007).** Biochemical and histological hepatic changes of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* exposed to carbaryl. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. **89**: 73-80.
- McMichael M. (2007).** Oxidative stress, antioxidants, and assessment of oxidative stress in dogs and cats. *JAVMA*. **231(5)**: 714-720.
- Meister R.T. (1991).** Farm chemicals handbook 91. Meister Publishing Company, Willoughby, Ohio.
- Messaoudi I., Hammouda F., El Heni J., Baati T., Saïd K., Kerkeni A. (2010).** Reversal of cadmium-induced oxidative stress in rat erythrocytes by selenium, zinc or their combination. *Experimental and Toxicologic Pathology*. **62**: 281-288.
- Messarrah M., Boulakoud M.S., Boumendjel A., Abdennour C., El Feki A. (2007).** The impact of thyroid activity variations on some oxidizing-stress parameters in rats. *C. R. Biologies*. **330**: 107-112.
- Messarrah M., Klibet F., Boumendjel A., Abdennour C., Bouzerna N., Boulakoud M.S., El Feki A. (2012).** Hepatoprotective role and antioxidant capacity of selenium on arsenic induced liver injury in rats. *Experimental and Toxicologic Pathology*. **64**: 167-174.
- Messarrah M., Amamra W., Boumendjel A., Barkat L., Bouasla I., Abdennour C., El Feki A. (2013).** Ameliorating effects of curcumin and vitamin E on diazinon-induced oxidative damage in rat liver and erythrocytes. *Toxicology and Industrial Health*. **29(1)**: 77-88.
- Mézes M., Balogh K. (2009).** Prooxidant mechanisms of selenium toxicity-a review. *Acta Biol. Szegediensis*. **53(Suppl. 1)**: 15-18.
- Miyazaki T., Yashikia M., Kojimaa T., Chikasuea F., Ochiaib A., Hidani Y. (1989).** Fatal and non-fatal methomyl intoxication in an attempted double suicide. *Forensic Sci. Int.* **42(3)**: 263-270.
- Mohamadin A.M., Sheikh B., Abd El-Aal A.A., Elberry A.A., Al-Abbasi F.A. (2010).** Protective effects of *Nigella sativa* oil on propoxur-induced toxicity and oxidative stress in rat brain regions. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. **98**: 128-134.

- Mohamed M., Abdellatif M.D., Sabar A., Elglammal M.D. (2003).** Sodium fluoride ion and renal function after prolonged sevoflurane or isoflurane anaesthesia. *Eng. J. Anaesth.* **19**: 79-83.
- Morini P., Casalino E., Sblanco C., Landriscina C. (1991).** The response of rat liver lipid peroxidation, antioxidant enzyme activities and glutathione concentration of the thyroid hormone. *Int. J. Biochem.* **23**: 1025-1030.
- Moriya F., Hashimoto Y. (2005).** A fatal poisoning caused by methomyl and nicotine. *Forensic Sci. Int.* **49**: 167-170.
- Mossa A-T.H., Heikal T.M., Omara E.A.Z. (2014).** Liver damage associated with exposure to aspirin and diazinon in male rats and the ameliorative effect of selenium. *Biomed. Aging Pathol.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomag.2014.01.004>.
- Mugesh G., Panda A., Singh H. B., Punekar N. S., Butcher R. J. (2001).** Glutathione peroxidase-like antioxidant activity of diaryl diselenides: A mechanistic study. *Journal of the American Chemical Society.* **123**: 839-850.
- Murray R.L. (1984).** Alanine aminotransferase. Clin. Chem. Toronto. Princeton. 1088-1090.
- Murray R.L. (1984).** Aspartate aminotransferase. Clin. Chem. Toronto. Princeton. 1112-1116.
- Murray R.L. (1984).** Creatinine. Clin. Chem. Toronto. Princeton. 1261-1266.

N

- Naito H.K. (1984).** Cholesterol. Clin. Chem. Toronto. Princeton. 1194-11206.
- Navarro C.M., Montilla P.M. Martin A., Jimenez J., Utrilla P.M. (1993).** Free radicals scavenger and antihepatotoxic activity of rosmarinus. *Plant. Med.* **59**: 312-314.
- Navarro-Alarcon M., Cabrera-Vique C. (2008).** Selenium in food and the human body: A review. *Science of the Total Environment.* **400**: 115-141.
- Navarro-Alarcon M., Lopez-Martinez M.C. (2000).** Essentiality of selenium in human body: relationship with different diseases. *Science of the Total Environment.* **249(1-3)**: 347-371.
- Neuzil J., Stocker R. (1993).** Bilirubin attenuates radical-mediated damage to serum albumin. *FEBS Lett.* **331(3)**: 281-284.

O

Ognjanovic B.I., Markovic S.D., Pavlovic S.Z, Zikic R.V, Stajn A.S, Saicic Z.S. (2008). Effect of chronic cadmium exposure on antioxidant defense system in some tissues of rats: protective effect of selenium. *Physiol. Res.* **57**: 403-411.

Ogut S., Gultekin F., Kisioglu A.N., Kucukoner E. (2011). Oxidative stress in the blood of farm workers following intensive pesticide exposure. *Toxicol. Ind. Health.* **27**: 820-825.

Ozden S., Catalgol B., Gezinci-Oktayoglu S., Arda-Pirincci P., Bolkent S., Alpertunga B. (2009). Methiocarb-induced oxidative damage following subacute exposure and the protective effects of vitamin E and taurine in rats. *Food and Chemical Toxicology.* **47**: 1676-1684.

P

Pach D., Gawlikowski B., Huszno B., Targosz D. (1998). The evaluation of carbofuran hepatotoxicity in acute poisoning. *Toxicol. Lett.* **95**: 164.

Packer L., Witt E.H., Tritschler H.J. (1995). Alpha-lipoic acid as a biological antioxidant. *Free Radical Biology and Medicine.* **19(2)**: 227-250.

Padayatty S.J., Katz A., Wang Y., Eck P., Kwon O., Lee J.H., Shenglin Chen S., Corpe C., Dutta A., Sudhir K Dutta S.K., Mark Levine M. (2003). Vitamin C as an Antioxidant: Evaluation of Its Role in Disease Prevention. *American College of Nutrition.* **22(1)**: 18-35.

Pal R., Ahmed T., Kumar V., Suke S.G., Ray A., Banerjee B.D. (2009). Protective effects of different antioxidants against endosulfan-induced oxidative stress and immunotoxicity in albino rats. *Indian J. Exp. Biol.* **47**: 723-729.

Patil J.A.A, Patil A.J.V., Sontakke A.V., Govindwar S.P. (2008). Effect of methomyl on hepatic mixed function oxidases in rats. *Indian J. Pharmacol.* **40**: 158-163.

Periera J.L., Gonçalves F. (2007). Effects of food availability on the acute and chronic toxicity of the insecticide methomyl to *Daphnia* spp. *Sci. Total Environ.* **386**: 9-20.

Pesce A. (1984). Lactate dehydrogenase. Clin. Chem. Toronto. Princeton. 1124-117.

Pope C., Karanth S., Liu J. (2005). Pharmacology and toxicology of cholinesterase inhibitors: Uses and misuses of a common mechanism of action. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **19(3)**: 433-446.

Porter J.M., Ivatury R.R., Azimuddin K., Swami R. (1999). Antioxidant study in prevention of organ dysfunction syndrome and infectious complications after trauma: early results of a prospective randomized study. *Am. Surg.* **65**: 478-483.

Possamai F.P., Fortunato J.J., Feier G., Agostinho F.R., Quevedo J., Wilhelm Filho D., Dal-Pizzol F. (2007). Oxidative stress after acute and sub-chronic malathion intoxication in Wistar rats. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **23**: 198-204.

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

Prabu S.M., K. Shagirtha K., Renugadevi J. (2011). Quercetin in combination with vitamins (C and E) improve oxidative stress and hepatic injury in cadmium intoxicated rats. *Biomedicine & Preventive Nutrition.* **1**: 1-7.

R

Radad K., Hashim A., EL-Sharqawy E.E.G., EL-Din Youssef M.S. (2009). Histopathological effects of methomyl on sprague-dawley rats after repeated application. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine.* **12(2)**: 149-157.

Rahman M.F., Siddiqui M.K., Jamil K. (2000). Acid and alkaline phosphatase activities in a novel phosphorothionate (RPR-11) treated male and female rats. Evidence of dose and time-dependent response. *Drug Chem. Toxicol.* **23**: 497-509.

Rai D.K., Sharma B. (2007). Carbofuran induced oxidative stress in mammalian brain. *Mol. Biotechnol.* **37**: 66-71.

Rai D.K., Rai P.K., Rizvi S.I., Watal G., Sharma B. (2009). Carbofuran-induced toxicity in rats: Protective role of vitamin C. *Experimental and Toxicologic Pathology.* **61(6)**: 531-535.

Raina R., Verma P.K., Pankaj N.K., Prawez S. (2009). Induction of oxidative stress and lipid peroxidation in rats chronically exposed to cypermethrin through dermal application. *J. Vet. Sci.* **10**: 257-259.

Ramirez DC., Gomez-Mejiba SE., Corbett JT., Deterding LJ., Tomer KB., Mason RP. (2008). Cu/Zn-Superoxide Dismutase-driven Free Radical Modifications: Copper- and Carbonate Radical Anion-initiated Protein Radical Chemistry. *Biochemical Society.* **10**: 1-25.

Rana S.V., Rekha S., Seema V. (1996). Protective effects of few antioxidants on liver function in rats treated with cadmium and mercury. *Indian J. Exp. Biol.* **34**: 177-179.

Rayman M.P. (2012). Selenium and human health. *Lancet.* **379**: 1256-1268.

Reichel F-X. (2004). Guide pratique de toxicologie. 1^e édition. De Boeck, Bruxelles. 140-143.

Reichel F-X. (2010). Guide pratique de toxicologie. 2^e édition. De Boeck, Bruxelles. 202, 203, 148.

Ronald R., Eitenmiller W.O. and Landen J.R. (1999). Vitamin analysis for the health and food science. CRC Press, USA. 223-226.

Rosalki S. et al. (1993). *Clin. Chem.* **39(4)**: 648-652.

S

Saiyed H.N., Sadhu H.G., Bhatnazer V.K., Dewan A., Vendaib K., Kashyap S.K. (1992). Cardiac toxicity following short-term exposure to methomyl in spraymen and rabbits. *Hum. Exp. Toxicol.* **11**: 93-97.

Salama A.K., Osman K.A., Saber N.A. and Soliman S.A. (2005). Oxidative stress by different pesticides in the Land Snails, *Helix aspersa*. *Pakistan Journal of Biological Sciences.* **8(1)**: 92-96.

Samanta L., Chainy G.B. (1997). Comparison of hexachlorocyclohexane-induced oxidative stress in the testis of immature and adult rats. *Comp. Biochem. Physiol. C: Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* **118**: 319-327.

Saoudi M., Messarah M., Boumendjel A., Jamoussi K., El Feki A. (2011). Protective effects of vitamin C against haematological and biochemical toxicity induced by deltamethrin in male Wistar rats. *Ecotoxicology and Environmental Safety.* **74**: 1765-1769.

Sener G., Sehirli A.O., Ayanoglu-Dulger G. (2003). Melatonin protects against mercury (II)-induced oxidative tissue damage in rats. *Pharmacol Toxicol.* **93**: 290-296.

La ReSergent O., Griffon B., Cillard P., Cillard J. (2000). Alcool et stress oxydatif. *Pathol. Biol.* **49**: 689-695.

Seth V., Banerjee B.D., Chakravorty A.K. (2001). Lipid peroxidation, free radical scavenging enzymes, and glutathione redox system in blood of rats exposed to propoxur. *Pesticide Biochemistry and Physiology.* **71**: 133-139.

Shalaby M.A., El Zorba H.Y., Ziada R.M. (2010). Reproductive toxicity of methomyl insecticide in male rats and protective effect of folic acid. *Food and Chemical Toxicology.* **48**: 3221-3226.

Shalan M.G., Mostafa M.S., Hassouna M.M., Hassab El-Nabi S.E., El-Refaie A. (2005). Amelioration of lead toxicity on rat liver with Vitamin C and silymarin supplements. *Toxicology.* **206**: 1-15.

Shanthalatha A., Madhuranath B.N., Yajurvedi H.N. (2012). Effect of methomyl formulation, a carbamate pesticide on ovarian follicular development and fertility in albino mice. *J. Environ. Biol.* **33**: 33-37.

Sharma B. (1999). Effect of carbaryl on some biochemical constituents of the blood and liver of *Clarias batrachus*, a fresh-water teleost. *J. Toxicol. Sci.* **24**: 157-164.

- Sies H. (1991).** Role of reactive oxygen species in biological processes. *Klin. Wochenschr.* **69(21-23)**: 965-968.
- Silvertri E., Schiavo L., Lombardi A., Goglia F. (2005).** Thyroid Hormones as molecular determinants of thermogenesis. *Acta. Physiol. Scand.* **184**: 265-283.
- Simonoff M., Simonoff G. (1991).** Le sélénium et la vie. Editions Masson, Paris. 242p.
- Simons J.E., Yang R.S.E., Bernan E. (1995).** Evaluation of the nephrotoxicity of complex mixtures containing organic metals: advantages and disadvantages of the use of red-world complex mixtures. *Environ. Health. Perspect.* **103**: 67-71.
- Singh M., Sandhir R., Kiran R. (2010).** Oxidative stress induced by atrazine in rat erythrocytes: mitigating effect of vitamin E. *Toxicol. Mech. Methods.* **20**: 119-126.
- Sinhaseni P., Foongvidya S., Tayaputch N. (1995).** Exposure evaluation is a crucial step for Quantitative risk assessment of methomyl. *Arh. Hig. Rada. Toksikol.* **46**: 301-306.
- Sinisa F.D., Gordana C., Jelena D., Vukosava D. (2008).** The influence of vitamin C supplementation on the oxidative status of rat interscapular brown adipose tissue. *Journal of Thermal Biology.* **33(4)**: 238-243.
- Soudani N., Sefi M., BenAmara I., Boudawara T., Zeghal N. (2010).** Protective effects of Selenium (Se) on Chromium (VI) induced nephrotoxicity in adult rats. *Ecotoxicology and Environmental Safety.* **73**: 671-678.
- Steinberg F.M., Rucker R.B. (2013).** Vitamin C. In: Lennarz W.J., Lane M.D. Encyclopedia of Biological Chemistry. 2nd edition. Academic Press, New York. 530-534.
- Stevenson D.E., Kehrer J.P., Kolaja K.L., Walborg E.F., Klaunig Jr., J.E. (1995).** Effect of dietary antioxidants on dieldrin-induced hepato-toxicity in mice. *Toxicol. Lett.* **75**: 177-183.
- Strathmann T.J., Stone A.T. (2001).** Reduction of the pesticides oxamyl and methomyl by Fe(II): reaction kinetics and mechanism. *Environ. Sci. Technol.* **35**: 2461-2469.
- Suke S.G., Kumar A., Ahmed R.S., Chakraborti Ac, Tripathi A.K., Mediratta P.K., Banerjee B.D. (2006).** Protective effect of melatonin against propoxur-induced oxidative stress and suppression of humoral immune response in rats. *Indian J. Exp. Biol.* **44(4)**: 312-317.
- Sun W. (2001).** Reactive oxygen species and breast cancer carcinogenesis. *Breast Cancer.* **77**: 222.

T

Tamimi M., Qourzal S., Barka N., Assabbane A., Ait-Ichoua Y. (2008). Methomyl degradation in aqueous solutions by Fenton's reagent and the photo-Fenton system. *Sep. Purif. Technol.* **61**:103-108.

Tapiero H., Townsend D.M., Tew K.D. (2003). The antioxidant role of selenium and seleno-compounds. *Biomedicine & Pharmacotherapy.* **57**: 134-144.

Thérond P., Malvy D., Favier A. (1997). Toxicité du sélénium à doses pharmacologiques par voie orale. *Nutr. Clin. Métabol.* **11**: 91-101.

Tinggi U. (2003). Essentiality and toxicity of selenium and its status in Australia: a review. *Toxicology Letters.* **137**: 103-110.

Tinggi U. (2008). Selenium: its role as antioxidant in human health. *Environ. Health Prev. Med.* **13**: 102-108.

Tomlin C.D.S. (2000). The pesticide manual. 12th edition. The British Crop Protection Council, Surrey, UK. 620-621.

Tomlin C.D.S. (2006). The Pesticide Manual. 13th edition. British Crop Protection Council, Surrey, UK. 697-698.

Tomlin C.D.S. (2009). The Pesticide Manual. 15th edition. BCPC Publications. 757.

Traxer O., Huet B., Poindexter J., Pak C., Pearle M. (2003). Effect of ascorbic acid consumption on urinary stones risk factors. *J. Urol.* **17**: 397-401.

Tsai M.J., Wu S.N., Cheng H.A., Wang S.H., Chiang H.T. (2003). An outbreak of food-borne illness due to methomyl contamination. *Journal of Toxicology Clinical Toxicology.* **41(7)**: 969-973.

Tsatsakis A.M., Bertsiaris G.K., Mammias I.N., Stiakakis I., Georgopoulos D.B. (2001). Acute fatal poisoning by methomyl caused by inhalation and transdermal absorption. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **66**: 415-420.

U

Uzunhisarcikli M., Kalender Y. (2011). Protective effects of vitamins C and E against hepatotoxicity induced by methyl parathion in rats. *Ecotoxicology and Environmental Safety.* **74**: 2112-2118.

V

- Valko M., Rhodes C.J., Moncol J., Izakovic M., Mazur M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact.* **160**: 1-40.
- Van Scoy A.R., Yue M., Deng X., Tjeerdema R.S. (2013). Environmental Fate and Toxicology of Methomyl. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology.* **222**: 93-109.
- van Helden Y.G.J., Keijer J., Knaapen A.M., Heil S.G., Briedé J.J., van Schooten F.J., Godschalk R.W.L. (2009). β -Carotene metabolites enhance inflammation-induced oxidative DNA damage in lung epithelial cells. *Free Radical Biology Medicine.* **46**: 299-304.
- Viezeliene D., Jansen E, Rodovicius H., Kasauskas A., Ivanov L. (2011). Protective effect of selenium on aluminium-induced oxidative stress in mouse liver *in vivo*. *Environmental Toxicology and Pharmacology.* **3(1)**: 302-306.
- Villar D., Balvin D., Giraldo C., Motas M., Olivera M. (2010). Plasma and brain cholinesterase in methomyl-intoxicated free-ranging pigeons (*Columba livia f. domestica*). *J. Vet. Diagn. Invest.* **22**: 313-315.

W

- Waring WS., Convery A., Mishra V., Shenkin A., Webb DJ., Maxwell SR. (2003). Uric acid reduces exercise-induced oxidative stress in healthy adults. *Clin. Sci.* **105(4)**: 425-430.
- Wenger C. et al. (1984). Alkaline phosphatase. Clin. Chem. Toronto. Princeton. 1094-1098.
- WHO (World Health Organization). (2005). The WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification: 2004. World Health Organization, Geneva, Switzerland. 19.

Y

- Yang Z.P., Dettbarn W.D. (1996). Isopropyl phosphorofluoridate induced cholinergic hyperactivity and lipid peroxidation. *Toxicology and Applied Pharmacology.* **138**: 48-53.
- Yarsan E., Tanyuksel M., Celik S., Aydin A. (1999). Effects of aldicarb and malathion on lipid peroxidation. *Bulletin of Environment Contamination and Toxicology.* **63**: 575-581.
- Yousef M.I. (2004). Aluminium-induced changes in hemato-biochemical parameters, lipid peroxidation and enzyme activities of male rabbits: protective role of ascorbic acid. *Toxicology.* **199**: 47-57.

Yousef M.I., Demerdash F.M., Kamei K.I., Salhen K.S. (2003). Changes in some hematological and biochemical indices of rabbits induced by isoflavones and cypermethrin. *Toxicology*. **189**: 223-234.

Z

Zaahkouk S.A.M., Helal E.G.E., Abd-Rabo T.E.I, Rashed S.Z.A. (2000). Carbamate Toxicity and Protective effect of vitamin A and Vitamin E on some biochemical aspects of male albino rats. *The Egyptian Journal of Hospital Medicine*. **1**: 60-77.

Zaidi S.M.K.R., Banu N. (2004). Antioxidant potential of vitamins A, E and C in modulating oxidative stress in rat brain. *Clinica Chimica Acta*. **340**: 229-233.

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



Activités de recherches

Article

Djeffal A., Messarah M., Boumendjel A., Kadeche L., El Feki A. (2012). Protective effects of vitamin C and selenium supplementation on methomyl-induced tissue oxidative stress in adult rats. *Toxicology and Industrial Health*. 1-13.

<http://tih.sagepub.com/content/early/2012/12/05/0748233712468020>

Protective effects of vitamin C and selenium supplementation on methomyl-induced tissue oxidative stress in adult rats

Assia Djeflal, Mahfoud Messarah, Amel Boumendjel, Lilia Kadeche and Abdelfattah El Feki
Toxicol Ind Health published online 6 December 2012
DOI: 10.1177/0748233712468020

The online version of this article can be found at:
<http://tih.sagepub.com/content/early/2012/12/05/0748233712468020>

Published by:



<http://www.sagepublications.com>

Additional services and information for *Toxicology and Industrial Health* can be found at:

Email Alerts: <http://tih.sagepub.com/cgi/alerts>

Subscriptions: <http://tih.sagepub.com/subscriptions>

Reprints: <http://www.sagepub.com/journalsReprints.nav>

Permissions: <http://www.sagepub.com/journalsPermissions.nav>

>> [OnlineFirst Version of Record](#) - Dec 6, 2012

[What is This?](#)

Protective effects of vitamin C and selenium supplementation on methomyl-induced tissue oxidative stress in adult rats

Toxicology and Industrial Health
1–13
© The Author(s) 2012
Reprints and permissions:
sagepub.co.uk/journalsPermissions.nav
DOI: 10.1177/0748233712468020
tih.sagepub.com


Assia Djeflal^{1,2}, Mahfoud Messarah¹, Amel Boumendjel¹,
Lilia Kadeche³ and Abdelfattah El Feki⁴

Abstract

Methomyl (MET) is used worldwide in agriculture and health programs. Besides its advantages in the agriculture, it causes several toxic effects. The objective of this study was to examine the potential ability of vitamin C and/or selenium (Se), to alleviate the oxidative damage parameters, against MET-induced changes in blood biochemical markers and oxidative damage in liver and kidney of male Wistar rats. The animals were randomized into five groups of eight each: group I served as control rats; group II received MET (8 mg/kg body weight (BW)) in drinking water; group III received both MET and vitamin C (200 mg/kg BW; by intraperitoneal injection); group IV received both MET and Se (0.6 mg/100 g BW). Animals of group V were treated with MET, vitamin C and Se. A significant increase in the levels of hepatic markers enzymes (alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, alkaline phosphatase and lactate dehydrogenase) was determined. Furthermore, renal markers such as urea and creatinine were increased in MET-treated rats. Additionally, serum cholesterol and triglycerides were significantly enhanced. Exposure of rats to MET caused significant increase in malondialdehyde levels, thus causing a drastic alteration in antioxidant defense system, particularly in the activities of catalase and glutathione-S-transferase and glutathione peroxidase. However, simultaneous supplementation with vitamin C and Se restored these parameters partially. In conclusion, the results of the current study revealed that MET-induced toxicity caused perturbations of some biochemical parameters, lipid peroxidation and alterations in the antioxidant enzymes in liver and kidney homogenates. Administration of vitamin C and Se exhibited protective effect by inhibiting MET-induced toxicity in liver and kidney.

Keywords

Antioxidants, biochemical parameters, protective effects, selenium, methomyl, vitamin C, oxidative stress, rat

Introduction

Pesticides have been used in agriculture to enhance food production by eradicating unwanted insects and controlling disease vectors; nevertheless, an occupational exposure to high levels of these compounds can lead to neurodegenerative disorders, characterized by serious oxidative and neurotoxic effects. Carbamates are widely used in household, gardens and agriculture as insecticides, herbicides, fungicides and molluscicides.

Methomyl (MET) (Lannate[®]), *S*-methyl *N*-(methylcarbamoyloxy) thioacetimidate (C₅H₁₀N₂O₂S), is a carbamate insecticide introduced by DuPont in 1966 with anticholinesterase activity. As a broad spectrum of insecticide, it is one of the most frequently used

¹ Laboratory of Biochemistry and Environmental Toxicology, Faculty of Sciences, Badji Mokhtar University, Annaba, Algeria

² Applied Biochemistry and Microbiology Laboratory, Faculty of Sciences, Badji Mokhtar University, Annaba, Algeria

³ Animal Ecophysiology Laboratory, Faculty of Sciences, Badji Mokhtar University, Annaba, Algeria

⁴ Animal Ecophysiology Laboratory, Faculty of Sciences, Sfax, Soukra road, Tunisia

Corresponding author:

Mahfoud Messarah, Laboratory of Biochemistry and Environmental Toxicology, Faculty of Sciences, Badji Mokhtar University, BP 12 Sidi Amar, Annaba, Algeria

Email: mahfoud.messarah@univ-annaba.org; mmessarahdz@yahoo.fr

pesticides in agriculture (Sinhaseni et al., 1995). It has high-acute median lethal dose (LD₅₀) of 30–34 mg kg⁻¹ body weight (BW) to rats and is classified as a highly hazardous (class 1B) compound by the World Health Organization (WHO, 2004). Also, MET is widely used in the agricultural production in Algeria (Agricultural Ministry, Algeria 'Alphyte Spa: Algerienne des phytosanitaires'). Human exposure occurs during occupational handling of the pesticide, spraying of flies and ingestion of food contaminated by MET (Radwan et al., 2008). However, the exposure to MET exerts toxic actions on the nervous system, liver, kidney, muscle and eye (Aron and Howland, 1998; Tsai et al., 2003). Some carbamates are extremely toxic to the central nervous system, and they are suspected to be carcinogens and mutagens (Maran et al., 2009). Pesticides with such properties have been shown to cause overproduction of reactive oxygen species (ROS) in both intra- and extracellular spaces, resulting in the disturbance of prooxidant/antioxidant balance of the cells thereby inducing oxidative stress (Abdollahi et al., 2004). Several studies indicate that the pesticide intoxication produces oxidative stress by the generation of free radicals and induces tissue lipid peroxidation in mammals and other organisms (El-Demerdash et al., 2004; El-Demerdash, 2011; Oruç and Üner, 2000).

In the current study, two potent antioxidants, that is vitamin C and Se, have been selected to evaluate its protective effect against oxidative stress induced by MET. Vitamin C (ascorbic acid) is a well-known low-molecular-weight antioxidant that protects the cellular compartment from the water-soluble oxygen nitrogen radicals (Jurczuk et al., 2007; Kalender et al., 2010). Supplementation with vitamin C (500 or 1000 mg/day) during 13 weeks in 48 healthy men and women has shown to increase the lymphocyte ascorbate by 51%, accompanied by an increase in lymphocyte glutathione (GSH) by 18% (Lenton et al., 2004). Because of the health problems induced by many environmental pollutants, much effort has been expended in evaluating the relative antioxidant potency of vitamin C.

Selenium (Se) is an essential dietary trace element, which plays a vital role as an antioxidant. Se is an integral part of many proteins with catalytic and structural functions. Its nutritional deficiency leads to muscular dystrophy, endemic fatal cardio myopathy (Keshan disease) and chronic degenerative diseases in humans that could be prevented by Se supplementation when used alone or in combination (Rayman,

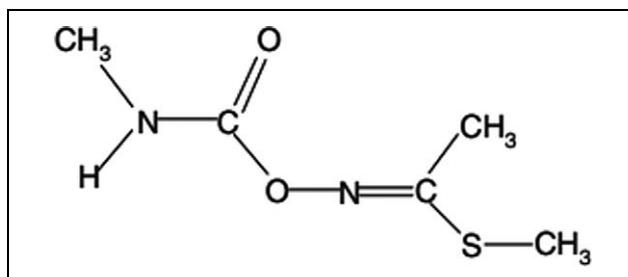


Figure 1. Chemical structure of MET.

2004). The most important metabolic roles of Se in mammalian cells are due to its function in the active site of many antioxidant enzymes, for example thioredoxin reductase and glutathione peroxidase (GPx) (Flora et al., 2002). To our knowledge, the potential protective effect of vitamin C and/or Se on MET-induced oxidative damage has not been explored. Based on the above information, we hypothesize that vitamin C and/or Se can reduce MET-induced hepatic and renal injuries. The aims of the present study were: (i) to evaluate the effect of MET on lipid peroxidation, GSH and antioxidant enzyme systems, such as catalase (CAT), GPx and glutathione-S-transferase (GST), of liver and kidney, (ii) to evaluate liver and kidney functions, serum alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), alkaline phosphatase (ALP), lactate dehydrogenase (LDH) and (iii) to investigate the possible protective role of vitamin C and/or Se against this pesticide.

Material and methods

Chemicals

MET (C₅H₁₀N₂O₂S) is a synthetic carbamate insecticide (Figure 1); CAS chemical name: *S*-methyl *N*-(methylcarbamoyloxy) thioacetimidate, with a CAS registry number 16752-77-5. The commercial formulation of MET, namely 'Lannate', was used in the experiments. All other chemical products used in this study were purchased from Sigma Chemical Co. (St Louis, France).

Animals and experimental design

MET was applied as a commercial powder formulation containing 25% of active ingredient from Alphyte Spa 'Algerienne des phytosanitaires'.

A total of 40 male Wistar rats (aged 9 weeks; weighing 200–250 g) were obtained from the Pasteur Institute

(Algiers, Algeria). Animals were acclimated for 2 weeks under the same laboratory conditions of photoperiod (12 h light: 12 h dark cycle), a minimum relative humidity of 40% and room temperature of $23 \pm 2^\circ\text{C}$. Food (standard diet; ONAB, El-Harrouch, Algeria) and water were made available *ad libitum*. The animals were randomized into five groups of eight each. The first group of rats served as the control, which received *ad libitum* water and 0.5 ml of saline solution given intraperitoneally. The second group received MET (8 mg/kg BW) in drinking water, the third group (MET + Se) received both MET and Se (0.6 mg $\text{Na}_2\text{SeO}_3/100$ g BW in diet). While the fourth group (MET + Vit C) received both MET and vitamin C (200 mg/kg BW; by intraperitoneal injection in saline). Animals in the fifth group (MET + Se + Vit C) received MET, Se and Vit C.

During the treatment period (21 days), food and water intake as well as body weight of the animals were monitored during treatment.

The dose of MET was selected on the basis of previous studies (Fayez and Bahig, 1991). While vitamin C (200 mg/kg BW; by intraperitoneal injection in saline) dose was selected based on the clinical application and on the results from previous studies on human and experimental animals (Fetoui et al., 2010). The Se dose (0.6 mg sodium selenite (Na_2SeO_3)/100 g BW in diet) used in our experiments and in other findings gave high protection against arsenic-induced oxidative stress (Chattopadhyay et al., 2003). The experimental procedures were carried out according to the National Institute of Health Guidelines for Animal Care and approved by the Ethics Committee of our Institution.

At the end of the experiment, body weights of rats were recorded. Animals were killed by cervical decapitation to avoid animal stress; liver and kidney were immediately removed and weighed, and the organ weight ratio was calculated. The relative weight of organs (%) was calculated as grams per 100 grams body weight. Serum samples were obtained by the centrifugation of blood at 3000g for 15 min at 4°C , and were then divided into eppendorf tubes. Isolated sera were stored at -20°C until they were used for the biochemical analysis. About 1 g of liver and kidney was homogenized in 2 ml of phosphate-buffered saline (PBS) 1:2 (w/v; 1 g tissue with 2 ml PBS, pH = 7.4). Homogenates were centrifuged at 10,000g for 15 min at 4°C , and the resultant supernatant was used for the determination of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), reduced GSH and

protein levels in one hand, and for measuring the activity of CAT, GPx and GST, on the other hand.

Biochemical estimations

The transaminase activities (AST and ALT). ALP and LDH activities as well as total cholesterol, triglyceride, creatinine and urea were measured using commercial kits obtained from Spinreact (Spain).

Lipid peroxidation levels and antioxidant enzyme activities

Lipid peroxidation levels. The lipid peroxidation levels in liver and kidney homogenates was measured as malondialdehyde (MDA), which is the end product of lipid peroxidation and reacts with thiobarbituric acid (TBA) as a TBARS to produce a red colored complex that has peak absorbance at 532 nm according to Buege and Aust (1984). Supernatant of 125 μl was homogenized by sonication using 50 μl of PBS and 125 μl of trichloroacetic acid (TCA)–butylhydroxytoluene in order to precipitate proteins and then was centrifuged (1000g, 10 min, and 4°C). Supernatant of 200 μl was mixed with 40 μl of HCl (0.6 M) and 160 μl of TBA dissolved in Tris, and the mixture was heated at 80°C for 10 min. The absorbance of the resultant supernatant was read at 530 nm. The amount of TBARS was calculated using a molar extinction coefficient of 1.56×10^5 M/cm.

Reduced GSH level. GSH level was estimated using a colorimetric technique, as mentioned by Ellman (1959), modified by Jollow et al. (1974), based on the development of yellow color when 5, 5 dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) is added to the compounds containing sulfhydryl groups. In brief, 0.8 ml of liver supernatant was added to 0.3 ml of 0.25% sulfosalicylic acid and the tubes were centrifuged at 2500g for 15 min. The supernatant (0.5 ml) was mixed with 0.025 ml of 0.01 M DTNB and 1 ml phosphate buffer (0.1 M, pH 7.4). Finally, absorbance at 412 nm was recorded. Total GSH content was expressed as nanomoles of GSH per milligram of protein.

Activity of GPx. GPx (EC 1.11.1.9) activity in liver and kidney tissues was assessed by the method of Flohe and Gunzler (1984). Supernatant obtained after centrifuging 5% of liver and kidney homogenate at 1500g for 10 min followed by 10,000g for 30 min at 4°C was used for GPx assay. Reaction mixture of 1 ml was prepared which contained 0.3 ml of phosphate buffer (0.1 M, pH 7.4), 0.2 ml of GSH (2 mM), 0.1 ml of

Table 1. The effects of Se and vitamin C (vit C) on body weight, absolute and relative liver and kidney weights of control and rats treated with MET after 3 weeks of treatment^a

Parameters and groups	Control	MET	MET + Se	MET + vit C	MET/Se + vit C
Initial body weight (g)	208.87 ± 19.15	208 ± 27.65	208.62 ± 19.7	210.12 ± 14.85	207.87 ± 20.4
Final body weight (g)	237.21 ± 21.16	210 ± 13.54 ^b	220.3 ± 12.24	222 ± 11.32	230.21 ± 6.05 ^c
Absolute liver weight (g)	7.52 ± 0.27	8.23 ± 0.68 ^b	7.33 ± 0.45 ^d	7.31 ± 0.41 ^d	7.17 ± 0.61 ^c
Relative liver weight (g/100 g BW)	3.199 ± 0.37	3.936 ± 0.42 ^e	3.34 ± 0.3 ^d	3.3 ± 0.25 ^c	3.12 ± 0.31 ^c
Absolute kidney weight (g)	1.34 ± 0.11	1.5 ± 0.14 ^b	1.13 ± 0.1 ^{c,f}	1.24 ± 0.1 ^{b,c}	1.10 ± 0.14 ^{b,c}
Relative kidney weight (g/100 g BW)	0.567 ± 0.03	0.715 ± 0.1 ^e	0.516 ± 0.06 ^c	0.562 ± 0.04 ^d	0.481 ± 0.07 ^{c,e}

Se: selenium; MET: methomyl.

^aValues are given as mean ± SEM for group of eight animals each.

^bSignificant differences: MET; MET + Se; MET + Vit C; MET + Se + Vit C versus control group: $p < 0.05$.

^cSignificant differences: MET + Se; MET + Vit C; MET + Se + Vit C versus MET group: $p < 0.01$.

^dSignificant differences: MET + Se; MET + Vit C; MET + Se + Vit C versus MET group: $p < 0.05$.

^eSignificant differences: MET; MET + Se; MET + Vit C; MET + Se + Vit C versus control group: $p < 0.01$.

^fSignificant differences: MET + Se; MET + Vit C; MET + Se + Vit C versus MET group: $p < 0.001$.

sodium azide (10 mM), 0.1 ml of hydrogen peroxide (H₂O₂) (1 mM) and 0.3 ml of tissue supernatant. After incubation at 37°C for 15 min, reaction was terminated by the addition of 0.5 ml of 5% TCA. Tubes were centrifuged at 1500g for 5 min and the supernatant was collected. Totally, 0.2 ml of phosphate buffer (0.1 M, pH 7.4) and 0.7 ml of DTNB (0.4 mg/ml) were added to 0.1 ml of reaction supernatant. After mixing, absorbance was recorded at 420 nm.

Activity of GST. GST (EC 2.5.1.18) catalyzes the conjugation reaction with glutathione in the first step of mercapturic acid synthesis. The activity of GST was measured according to the method of Habig et al. (1974). Chloro-dinitro benzene was used as the substrate. The absorbance was measured spectrophotometrically at 340 nm at 30 s of intervals for 3 min.

Activity of CAT. CAT (EC 1.11.1.6) activity was assayed by the method of Aebi (1984). The rate of H₂O₂ decomposition was followed by monitoring absorption at 240 nm. One unit of CAT activity is defined as the amount of enzymes required to decompose 1 mmol of H₂O₂ in 1 min. The enzyme activity was expressed as millimoles of H₂O₂ consumed per minute per milligram of protein.

Protein estimation

Protein was measured by the method of Bradford (1976), using bovine serum albumin as a standard.

Statistical analysis

Data are expressed as mean ± SEM. Data comparisons were carried out by using one-way analysis of variance followed by Student's *t* test to compare means between the different treatment groups. Differences were considered statistically significant at $p \leq 0.05$.

Results

Effect of treatment on body, liver and kidney weights, food intake and water consumption

As shown in Table 1, during the course of present investigations, it was observed that the body, relative weight of liver and kidney were lower in MET-treated rats when compared with controls. The weight loss was accompanied by a significant decrease in diet consumption when compared with controls (Table 2). Administration of vitamin C and/or Se of the MET-treated group produced recovery in the changes of food consumption.

Effect of treatment on serum biochemical parameters

Treatment with MET caused a significant increase in the activities of AST, ALT, ALP and LDH in the serum compared with controls. Serum urea and creatinine levels significantly increased only in MET group of rats compared with the control animals, indicating the induction of severe nephrotoxicity (Table 3). Treatment with vitamin C and/or Se

Table 2. The effects of Se and vitamin C (vit C) on daily food and water consumption of control and rats treated with MET after 3 weeks of treatment^a

Parameters and groups	Control	MET	MET + Se	MET + vit C	MET/Se + vit C
Food consumption (g/day/rat)	20.48 ± 1.2	15.7 ± 1.5 ^b	17 ± 1.6 ^b	22.2 ± 1.5 ^b	19.3 ± 1.7
Water consumption (ml/day/rat)	38 ± 6.6	19.6 ± 3 ^b	21 ± 1.1 ^b	21 ± 1.3 ^b	21.12 ± 1
Quantities of MET ingested (mg/day/rat)	–	1.635 ± 0.15	1.526 ± 0.1 ^c	1.524 ± 0.3 ^c	1.515 ± 0.18

Se: selenium; MET: methomyl.

^aValues are given as mean ± SEM for group of eight animals each.

^bSignificant differences: MET; MET + Se; MET + Vit C; MET + Se + Vit C versus control group: $p < 0.05$.

^cSignificant differences: MET + Se; MET + Vit C; MET + Se + Vit C versus MET group: $p < 0.05$.

Table 3. The effects of Se and vitamin C (vit C) on changes in biochemical parameters of control and rats treated with MET after 3 weeks of treatment^a

Parameters and groups	Control	MET	MET + Se	MET + vit C	MET/Se + vit C
AST (U/l)	21.8 ± 0.84	24.6 ± 0.89 ^b	21 ± 1.22 ^c	19.4 ± 0.96 ^{b,d}	19.6 ± 1.14 ^{e,c}
ALT (U/l)	79.6 ± 1.67	88.8 ± 1.92 ^b	84 ± 0.71 ^{b,f}	69.8 ± 1.92 ^{g,d}	86 ± 2.34 ^{b,f}
PAL (U/l)	20.56 ± 0.29	23.54 ± 1.33 ^e	19.73 ± 1.22 ^c	16.15 ± 1.99 ^c	17.34 ± 1.96 ^c
LDH (U/l)	931.07 ± 32	972.84 ± 4.2 ^e	962.8 ± 6.28 ^f	816 ± 87.02 ^f	832 ± 80.74 ^f
Triglyceride (mmol/l)	0.874 ± 0.03	1.42 ± 0.1 ^b	0.878 ± 0.07 ^{e,f}	0.936 ± 0.05 ^f	0.736 ± 0.1 ^{b,c}
Cholesterol (mmol/l)	1.148 ± 0.03	1.772 ± 0.01 ^e	1.552 ± 0.01 ^f	1.552 ± 0.01 ^f	1.542 ± 0.01 ^f
Urea (g/l)	0.4 ± 0.05	0.582 ± 0.02 ^e	0.492 ± 0.01 ^{e,f}	0.49 ± 0.02 ^{e,c}	0.44.6 ± 0.02 ^c
Creatinine (mg/dl)	4.2 ± 0.27	5.6 ± 0.22 ^e	4.4 ± 0.55 ^{e,f}	3.6 ± 0.55 ^{b,c}	3.6 ± 0.55 ^{b,c}

Se: selenium; MET: methomyl.

^aValues are given as mean ± SEM for group of eight animals each.

^bSignificant differences: MET; MET + Se; MET + Vit C; MET + Se + Vit C versus control group: $p < 0.01$.

^cSignificant differences: MET + Se; MET + Vit C; MET + Se + Vit C versus MET group: $p < 0.01$.

^dSignificant differences: MET + Se; MET + Vit C; MET + Se + Vit C versus MET group: $p < 0.001$.

^eSignificant differences: MET; MET + Se; MET + Vit C; MET + Se + Vit C versus control group: $p < 0.05$.

^fSignificant differences: MET + Se; MET + Vit C; MET + Se + Vit C versus MET group: $p < 0.05$.

^gSignificant differences: MET; MET + Se; MET + Vit C; MET + Se + Vit C versus control group: $p < 0.001$.

prevented the increase in the levels of serum urea and creatinine induced by MET treatment compared with the control group. The MET-treated rats also exhibited a significant increase in the cholesterol and triglyceride serum concentrations when compared with the control group. Supplementation of vitamin C and/or Se of the MET-treated group produced recovery in the above mentioned biochemical variables.

Effect of treatment on lipid peroxidation and GSH contents in liver

Changes in TBARS and GSH levels are illustrated in Figure 2. A significant increase in TBARS levels accompanied by a reduction in GSH levels in MET-treated rats was observed compared with those of controls. The supplementation of vitamin C and/or Se alleviated GSH and TBARS levels in hepatic tissue induced by MET treatment.

Effect of treatment on lipid peroxidation and GSH levels in kidney

When compared with controls, a significant increase in the TBARS levels accompanied by a reduction in GSH levels was found in the renal tissue of MET-treated rats (Figure 3). The coadministration of vitamin C and/or Se modulated the TBARS and GSH levels in renal homogenate.

Effect of treatment on antioxidant enzyme activities in liver and kidney

Exposure to MET produced significant adverse effects on the liver and kidney redox status, which is evidenced by significant depletion in CAT and GST activities compared with those of controls (Figures 4 and 5). Oral administration of MET to rats significantly increased in GPx activity. Cotreatment of vitamin C and/or Se produced recovery in the above

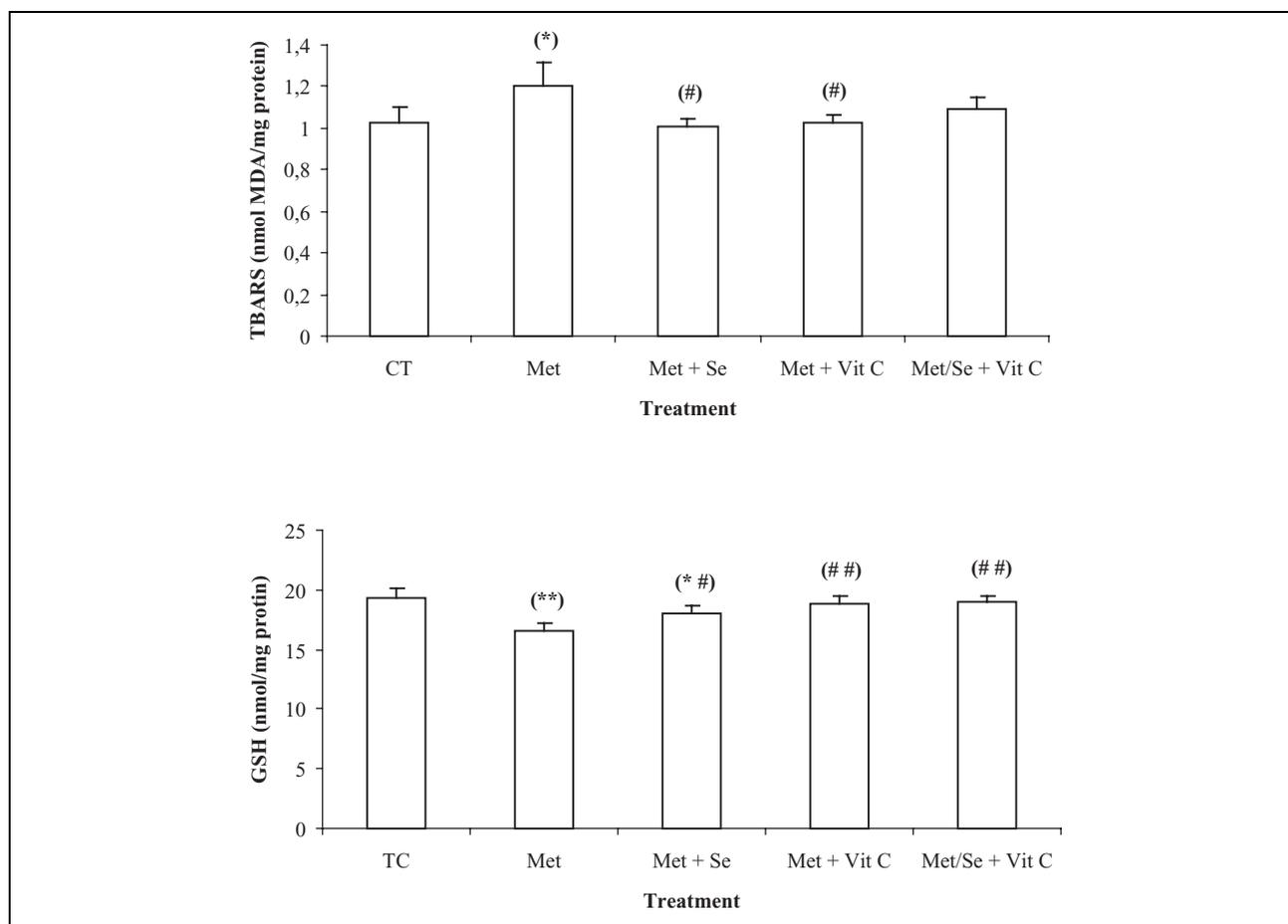


Figure 2. The effects of Se and vitamin C (vit C) on TBARS (nanomoles of MDA per milligram of protein) and reduced glutathione (nanomoles per milligram of protein) levels in liver of control and rats treated with MET after 3 weeks of treatment. Values are given as mean \pm SEM for group of eight animals each. Significant differences: *MET; MET + Se; MET + Vit C; MET + Se + Vit C versus control group (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$). #MET + Se; MET + Vit C; MET + Se + Vit C versus MET group (# $p < 0.05$; ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$). Se: selenium; MET: methomyl; TBARS: thiobarbituric acid reactive substances; MDA: malondialdehyde.

mentioned hepatic and renal oxidative stress parameters induced by MET treatment and significantly modulated the GPx, CAT and GST activities.

Discussion

Carbamates have been observed to accentuate oxidative stress in rat tissues, which lead to the overproduction of free radicals that exert deleterious effects on liver, kidney and brain (Banerjee et al., 1999; Kamboj et al., 2006). This disturbance is accompanied with the increase in marked oxidative impact as evidenced by the significant increase in hepatic and kidney lipid peroxidation and cell damage markers.

The results from the present research indicate that MET exposure has changed the body weight and relative weights of liver and kidney, leading however to

significant decrease in animal growth and production performances. During 3 weeks of treatment, we have noted an important daily decrease in food and water consumptions. These behavioral perturbations are probably attributed to the reduction in food intake due to excessive break down of tissue proteins (Chatterjea and Shinde, 2002). These observations of decreased body weight were similar to the study published by Al-Shinnawy (2008), who determined that thiodicarb (carbamate insecticide, which is the combination of two molecules of MET) recorded a marked reduction in the body weight, though the experimental periods when compared with control and similar phenomena were also detected by Saudi et al. (2011) and El-Demerdash et al. (2004). In our investigation, the coadministration of vitamin C and/or Se to the MET-treated group improved body, liver and kidney

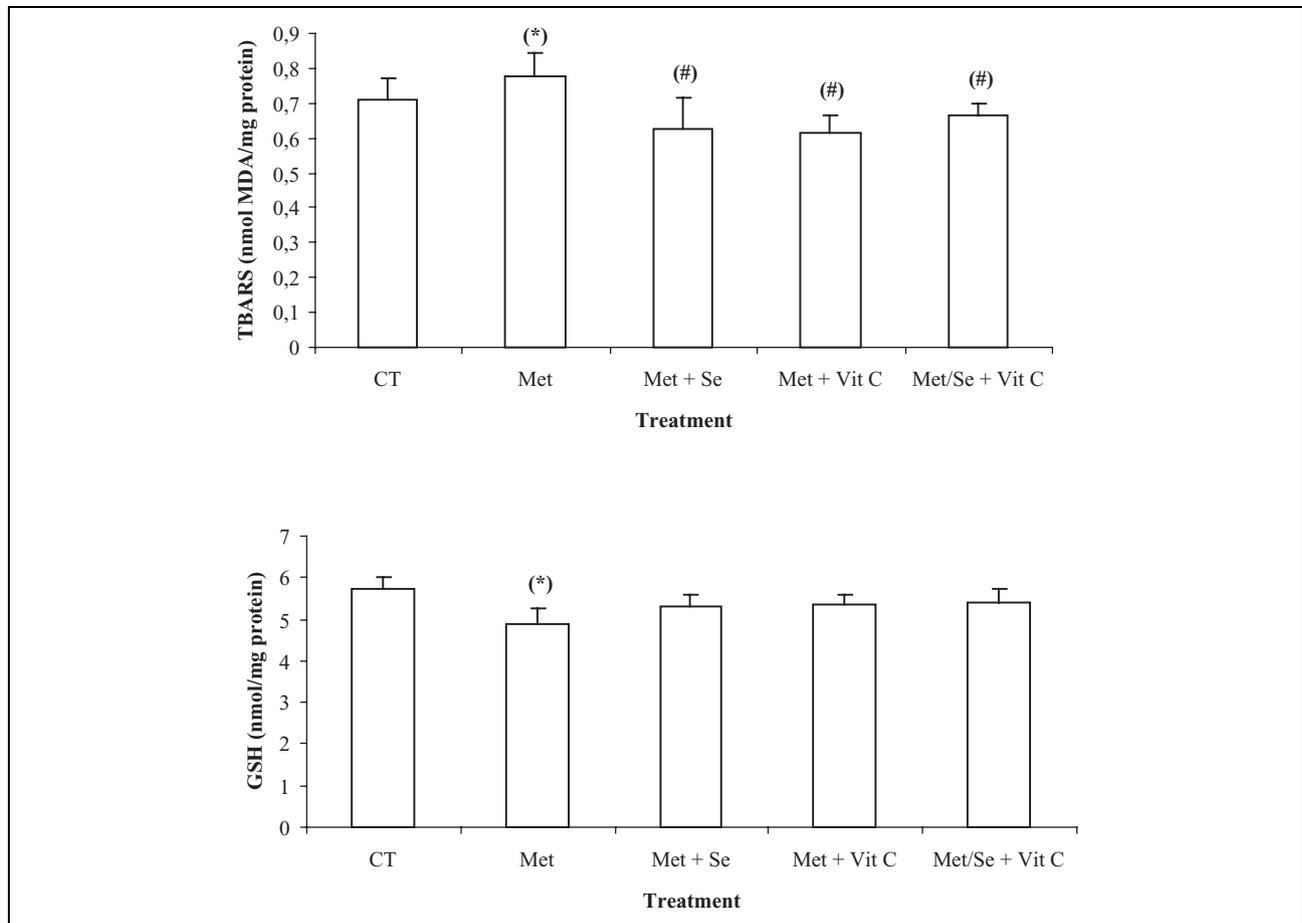


Figure 3. The effects of Se and vitamin C (vit C) on TBARS (nanomoles of MDA per milligram of protein) and reduced glutathione (nanomoles per milligram of protein) levels in kidney of control and rats treated with MET after 3 weeks of treatment. Values are given as mean \pm SEM for group of eight animals each. Significant differences: *MET; MET + Se; MET + Vit C; MET + Se + Vit C versus control group (* p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001). #MET + Se; MET + Vit C; MET + Se + Vit C versus MET group (# p < 0.05; ## p < 0.01; ### p < 0.001). Se: selenium; MET: methomyl; TBARS: thiobarbituric acid reactive substances; MDA: malondialdehyde.

weights, this could be attributed to an increase in the daily food consumption. These findings are compatible with the results of other studies (Ismail et al., 2009; Messarah et al., 2012; Sankar et al., 2010).

Several studies have shown that the carbamate insecticides can alter biochemical parameters in experimental animals (Garg et al., 2009; 2009a; Karami-Mohajeri and Abdollahi, 2011). One of the most sensitive and dramatic indicators of hepatocyte injury is the release of intracellular enzymes, such as AST, ALT, ALP and LDH in the circulation after MET administration. The elevated activities of these enzymes are indicative of cellular leakage and loss of the functional integrity of the cell membranes in liver (Abdulaziz and Hristev, 1996; Rajesh and Latha, 2004). Our results showed that the MET administration caused severe acute liver damage in rats,

demonstrated by the significant elevation of plasma AST, ALT, ALP and LDH levels, suggesting that excessive MET might cause critical injury to the organ. The increased levels of serum enzymes indicate an enhancement of permeability, damage or necrosis of hepatocytes. However, supplementation of vitamin C and/or Se to the MET-treated rats preventing the increase in the activities of these enzymes is the primary evidence of their hepatoprotective activity (Manawadi and Kaliwal, 2010).

Carbamate insecticides generally increase the total cholesterol and total lipid levels (Garg et al., 2009; Karami-Mohajeri and Abdollahi, 2011) and indeed, in the present study, MET elevated the cholesterol and triglyceride levels of the rats. This increase in serum cholesterol can be attributed to the effect of pesticides on the permeability of the

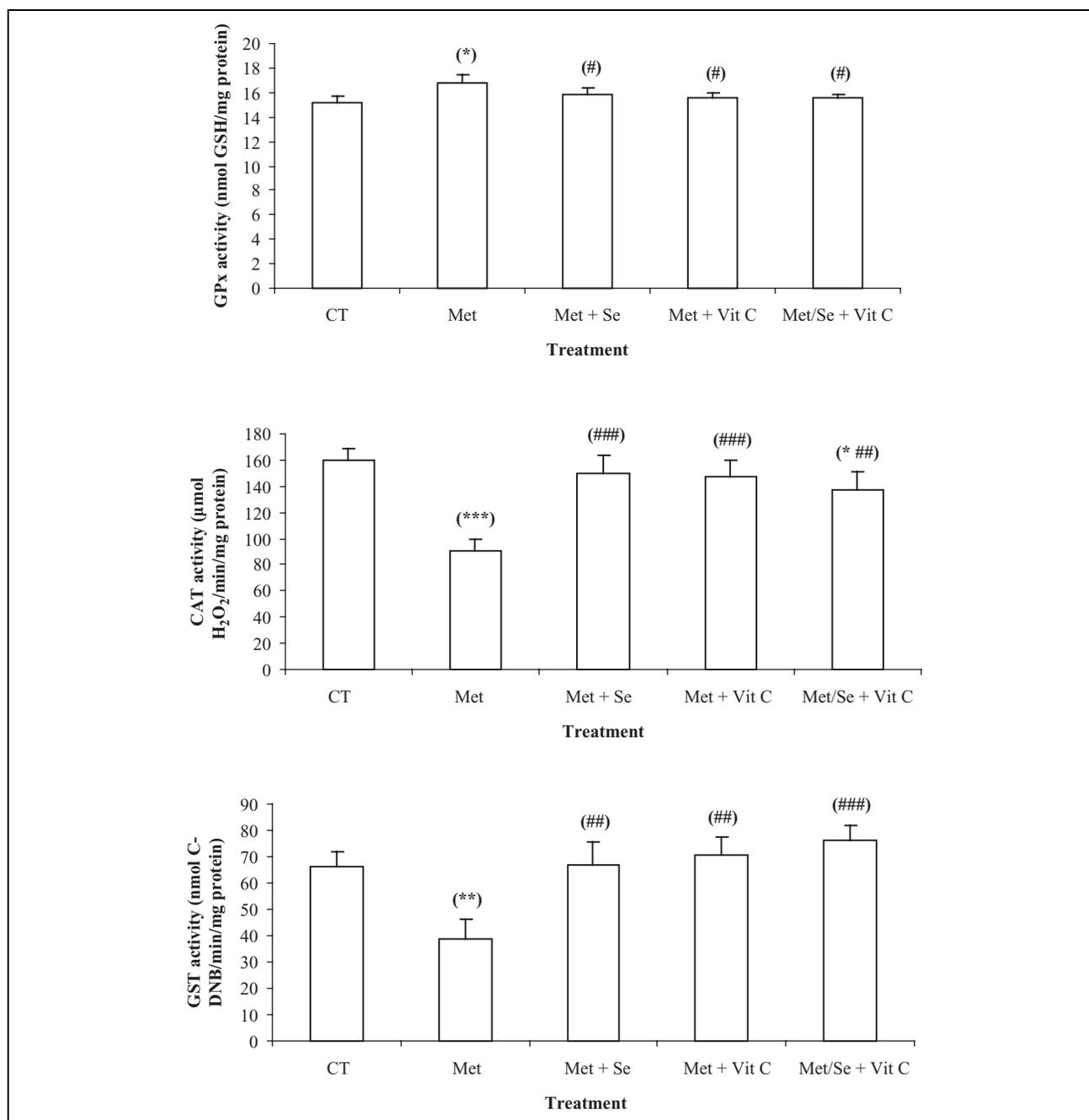


Figure 4. The effects of Se and vitamin C (vit C) on GPx, CAT and GST activities in liver of control and rats treated with MET after 3 weeks of treatment. Values are given as mean \pm SEM for group of eight animals each. Significant differences: *MET; MET + Se; MET + Vit C; MET + Se + Vit C versus control group (* p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001). # MET + Se; MET + Vit C; MET + Se + Vit C versus MET group (# p < 0.05; ## p < 0.01; ### p < 0.001). Se: selenium; MET: methomyl; GPx: glutathione peroxidase; CAT: catalase; GST: glutathione-S-transferase.

liver cell membrane (Yousef et al., 2003; 2006). Besides, the observed augmentation of cholesterol level in our work by MET is consistent with the finding of Ashgar et al. (1994), who reported that the total cholesterol was elevated in male rabbits treated with methyl parathion. Such an increase

might come from an enhanced synthesis of liver cholesterol (Enan et al., 1987). In addition, the observed rise of serum cholesterol concentration, which is associated with the increase in triglycerides, may indicate a possible membrane lipid peroxidation (Saoudi et al., 2011).

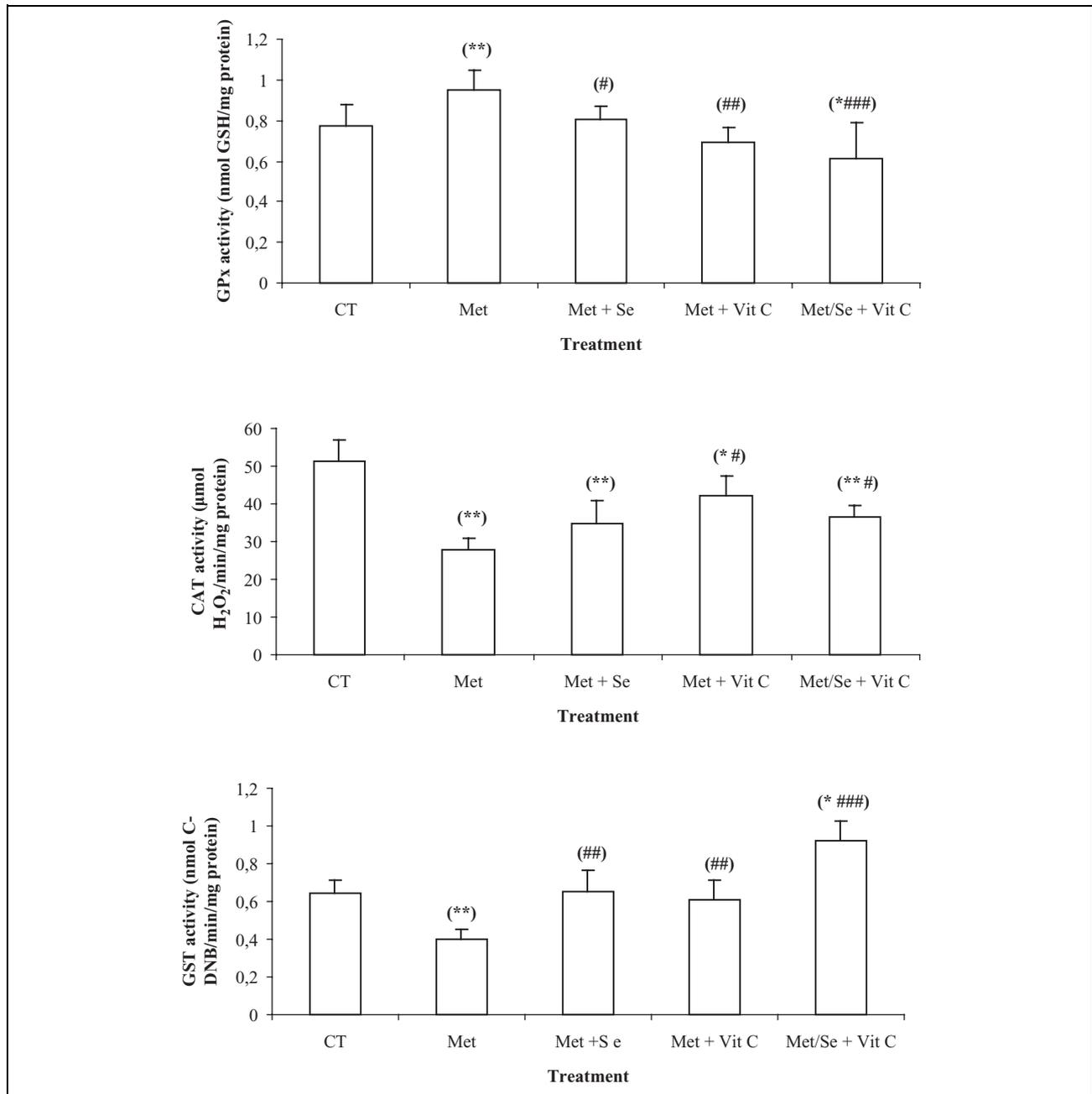


Figure 5. The effects of Se and vitamin C (vit C) on GPx, CAT and GST activities in kidney of control and rats treated with MET after 3 weeks of treatment. Values are given as mean \pm SEM for group of eight animals each. Significant differences: *MET; MET + Se; MET + Vit C; MET + Se + Vit C vs control group (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$). #MET + Se; MET + Vit C; MET + Se + Vit C vs MET group (## $p < 0.05$; ### $p < 0.01$; #### $p < 0.001$). Se: selenium; MET: methomyl; GPx: glutathione peroxidase; CAT: catalase; GST: glutathione-S-transferase.

Kidney markers like creatinine and urea were also estimated in the serum of experimental animals to confirm the renal damage. In the current study, the MET-treated rats also exhibited significantly higher urea and creatinine levels than the control rats. Similar changes in creatinine and urea values were reported in rabbits (Akhgari et al., 2003; Yousef

et al., 2003). The elevation of serum creatinine and urea are considered as significant markers of renal dysfunction (Marks and Lieberman, 2009). Elevated blood urea is correlated either with an increased protein catabolism in the mammalian body or from a more efficient conversion of ammonia to urea as a result of increased synthesis of enzymes involved in

urea production (Rodwell, 1979, Vanholder et al., 1992).

The treatment of rats with MET plus vitamin C and/or Se decreased serum cholesterol triglycerides, urea and creatinine levels compared with the rats treated with MET alone. In our experimental conditions, vitamin C and/or Se administered to rats were found to inhibit the effects of MET poisoning on the metabolism of lipids and on renal dysfunction markers. These findings are compatible with the results of other studies (Saoudi et al., 2011).

Carbamates have been observed to accentuate oxidative stress in rat tissues, which lead to the overproduction of free radicals that exert deleterious effects on liver, kidney, brain and erythrocytes (Banerjee et al., 1999; Kamboj et al., 2006; Mansour et al., 2009). In the present study, exposure of rats to MET through drinking water resulted in a significant increase in lipid peroxidation as indicated by the significant increase in MDA content suggesting that MET activated the formation of free radicals in hepatic and kidney tissues. These results corroborated with the previous findings which demonstrated that MET exposure stimulated the generation of ROS in erythrocytes (Mansour et al., 2009).

GSH acts as a multifunctional intracellular non-enzymatic antioxidant and protects the cells against several toxic oxygen-derived chemical species. It is considered to be an important scavenger of free radicals and a cofactor of several detoxifying enzymes against oxidative stress, for example GPx, GST and others. GSH is able to regenerate the most important antioxidants, vitamins C and E, back to their active forms (Valiko et al., 2006). A constant supply of reduced GSH is necessary to repair the effects of spontaneous oxidation of sulfhydryl groups, which result in cell membrane damage. In addition, GSH also participates in the detoxification of xenobiotics as a substrate for the enzyme GST. Glutathione and other thiol-containing proteins play a crucial key role in cellular defense against pesticides toxicity (Halliwell, 1994; Halliwell and Gutteridge, 1999; 2002). In our investigation, GSH level decreased in the liver and in kidney extracts of MET-treated group compared with control animals, which reflects its consumption through the oxidative stress. In agreement with this finding, the significant decrease of GSH content in MET-treated rats could lead to increased susceptibility to free radical damage. These effects have been previously observed by other authors *in vitro* and *in vivo* (Maran et al., 2009; Manawadi and

Kaliwal, 2010; Thompson et al., 2002). However, the administration of vitamin C and/or Se has increased the antioxidant enzyme activities in MET-treated rats, is probably related to its ability to reduce the accumulation of free radicals and regenerates the GSH (Gan et al., 2002, Garg et al., 2009).

Antioxidant enzymes are considered to be the first line of cellular defense against oxidative damage. Thus, the increased oxidative stress and cellular damage, caused by MET-treatment were evident by declined GPx, CAT and GST activities in liver and kidney tissues. The inhibition of these enzyme activities and an increase in lipid peroxidation probably lead to the intracellular accumulation of ROS with subsequent development of tissue injury. These results are in agreement with those of Manawadi and Kaliwal (2010) and El-Khawaga (2005). The toxicity of many xenobiotics is associated with the production of free radicals that are not only toxic themselves but are also implicating in the pathophysiology of many diseases (Abdollahi et al., 2004). However, the protective action of Se and vitamin C against MET-induced changes could be explained by the stimulation of free radical scavenger with the ability to protect the levels of antioxidants such as *N*-acetyl cysteine (Eraslan et al., 2007; Kamboj et al., 2006), vitamin E (Aldana et al., 2001; Garg et al., 2009a; Kalender et al., 2005; Messarah et al., 2012a), vitamin C (Aly et al., 2010; Grajeda-Cota et al., 2004), Se (Messarah et al., 2012; Saito and Takahashi, 2002) and to stimulate several antioxidative enzymes in preventing damage from free radicals insult. On the other hand, the protective action of Se against MET-induced toxicity might be explained according to Ognjanovic et al. (2008) and Messarah et al. (2012) by the important role of Se in preventing hydroxyl radicals' formation and in protecting the integrity and increased antioxidant capacity in cells. The scavenging property and the ability of vitamin C to inhibit the radical generation could further reduce the oxidative threat caused by MET. The supplementation of vitamin C increased the antioxidant enzyme activities in MET-treated rats that might be due to its ability to reduce the accumulation of free radical generation. The chelating property of vitamin C to react with free radicals or with highly reactive byproducts of lipid peroxidation as well as enhancement of tissue thiol pools might be responsible for the reduction of oxidative modification of enzymes and for a reversal of the activities of antioxidants and glutathione metabolizing enzymes (Fetoui et al., 2008; 2010; Verma

et al., 2007; Yousef, 2004). The decline in the levels of GSH, GPx, CAT and GST on MET administration may be due to the involvement of GSH level and these enzymes in the detoxification process of MET in liver and kidney. The insufficient level of these antioxidants may damage the cells via oxidative stress caused by MET. By enhancing these antioxidants, and thereby decreasing the lipid peroxidation, vitamin C and/or Se protects the cells.

In conclusion, the present data document that the MET is severely hepatic and renal toxic. Vitamin C and Se have the ability to protect the liver and kidney from the damaging effects of exposure to MET through the inhibition of lipid peroxidation and stimulation of endogenous antioxidative defense system.

Funding

This research received no specific grant from any funding agency in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

References

- Abdollahi M, Ranjbar A, Shadnia S, Nikfar S and Rezaie A (2004) Pesticides and oxidative stress: a review. *Medical Science Monitor* 10: 141–147.
- Abdulaziz M, Hristev H (1996) Serum aminotransferase, alkaline transferase and lactate dehydrogenase responses to oral consecutive doses of cyano-3 alpha-phenoxybenzyl pyrethroids on sheep. *Bulgarian Journal of Agricultural Science* 2: 661–666.
- Aebi H (1984) Catalase in vitro. *Methods in Enzymology* 105: 121–126.
- Akhgari M, Abdollahi M, Kebryaezadeh A, Hosseini R and Sabzevari O (2003) Biochemical evidence for free radical-induced lipid peroxidation as a mechanism for subchronic toxicity of malathion in blood and liver of rats. *Human and Experimental Toxicology* 22: 205–211.
- Aldana L, Tsutsumi V, Craigmill A, Silveira ML and de Mejia EG (2001) α -tocopherol modulates liver toxicity of the pyrethroid cypermethrin. *Toxicology Letters* 125: 107–116.
- Al-Shinnawy M (2008) Vitamin C as ameliorative agent against thiodicarb toxicated male albino rats (*Rattus norvegicus*). *Egyptian Academic Journal of Biological Science* 12: 177–187.
- Aly N, El-Gendy K, Mahmoud F and El-Sebae AK (2010) Protective effect of vitamin C against chlorpyrifos oxidative stress in male mice. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 97: 7–12.
- Aron CK, Howland MA (1998) *Insecticides: organophosphates and carbamates In: Goldfank Toxicology Emergencies*. 6th ed. New York, London, Sydney, Toronto, Tokyo, New Jersey: Appleton and Lange.
- Ashgar M, Sheikh MA and Hashmi A (1994) Effects of orally fed methyl parathion on some hematochemical parameters of rabbits. *Pakistan Veterinary Journal* 14: 34–36.
- Banerjee BDV, Bhattacharya A, Pasha ST and Chakraborty AK (1999) Biochemical effects of some pesticides on lipid peroxidation and free radical scavengers. *Toxicology Letters* 107: 3–47.
- Bradford M (1976) A rapid and sensitive method for the quantities of microgram quantities of protein utilizing the principle of proteinbinding. *Analytical Biochemistry* 72: 248–254.
- Buege JA, Aust SD (1984) Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology* 105: 302–310.
- Chatterjea MN, Shinde R (2002) *Text Book of Medical Biochemistry*. 5th ed. New Delhi, India: Jaypee Brothers, Medical Publishers Ltd, pp. 317.
- Chattopadhyay S, Sampa Pal G, Ghosh D and Debnath J (2003) Effect of dietary coadministration of sodium selenite on sodium arsenite-induced ovarian and uterine disorders in mature albino rats. *Toxicological Science* 75: 412–422.
- El-Demerdash FM (2011) Lipid peroxidation, oxidative stress and acetylcholinesterase in rat brain exposed to organophosphate and pyrethroid insecticides. *Food and Chemical Toxicology* 49: 1346–1352.
- El-Demerdash FM, Yousef MI, Kedwany FS and Baghdadi HH (2004) Role of α -tocopherol and β -carotene in ameliorating the fenvalerate-induced changes in oxidative stress, hemato-biochemical parameters and semen quality of male rats. *Journal of Environmental Science and Health B39*: 443–459.
- El-Khawaga OA (2005) Role of selenium on antioxidant capacity in methomyl-treated mice. *Journal of Physiology and Biochemistry* 61(4): 501–506.
- Ellman GL (1959) Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 82: 70–77.
- Enan E, Berberian IG, El-Fiki S, El-Masry M and Enan OH (1987) Effects of two organophosphorus insecticides on some biochemical constituents in the nervous system and liver of rabbits. *Journal of Environmental Science and Health B22*: 149–170.
- Eraslan G, Saygi S, Essiz D, Aksoy A, Gul H and Macit E (2007) Evaluation of aspect of some oxidative stress parameters using vitamin E, proanthocyanidin and N-acetylcysteine against exposure to cyfluthrin in mice. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 88: 43–49.
- Fayez V, Bahig MRE (1991) Short term toxicity of methomyl in rats. *Chemosphere* 23(3): 375–381.

- Fetoui H, Garoui M, Makni-ayadi F and Zeghal N (2008) Oxidative stress induced by lambda-cyhalothrin (LTC) in rat erythrocytes and brain: attenuation by vitamin C. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 26: 225–231.
- Fetoui H, Makni M, Garoui M and Zeghal N (2010) Toxic effects of lambda-cyhalothrin, a synthetic pyrethroid pesticide, on the rat kidney: involvement of oxidative stress and protective role of ascorbic acid. *Experimental and Toxicologic Pathology* 62: 593–599.
- Flohe L, Gunzler WA (1984) Analysis of glutathione peroxidase. *Methods in Enzymology* 105: 114–121.
- Flora SJS, Kannan GM, Pant BP and Jaiswal DK (2002) Combined administration of oxalic acid, succimer and its analogue for the reversal of gallium arsenide induced oxidative stress in rats. *Archives of Toxicology* 76: 269–276.
- Gan L, Liu Q, Xu HB, Zhu YS and Yang XL (2002) Effects of selenium overexposure on glutathione peroxidase and thioredoxin reductase gene expressions and activities. *Biological Trace Element Research* 89: 165–175.
- Garg DP, Bansal AK, Malhotra A, Kiran R and Dhawan DK (2009) Methomyl induced hematological and biochemical alterations protection by vitamin E. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 93(3): 127–132.
- Garg DP, Bhalla P, Kiran R, Bansal AK and Dhawan DK (2009a) Vitamin E-mediated protection in methomyl-induced alterations in rat liver. *Toxicological and Environmental Chemistry* 91(4): 685–698.
- Grajeda-Cota P, Ramírez-Mares MV, Gonzales de Mejía E (2004) Vitamin C protects against in vitro cytotoxicity of cypermethrin in rat hepatocytes. *Toxicology in Vitro* 18: 13–19.
- Habig WH, Pabst MJ and Jakoby WB (1974) Glutathione-S-transferase the first step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry* 249: 7130–7139.
- Halliwell B (1994) Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutrition Reviews* 52: 253–267.
- Halliwell B, Gutteridge JMC (1999) Glutathione in metabolism. In: Halliwell B and Gutteridge JMC (eds) *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford, UK: Clarendon Press, pp. 146–150.
- Halliwell B, Gutteridge JMC (2002) *Free Radicals in Biology and Medicine*, Oxford, UK: University Press Inc, pp. 105–245.
- Ismail RSA, El-Megeid Ashraf AA and Abdel-Moemin AR (2009) Carbon tetra chloride-induced liver disease in rats: the potential effect of supplement oil with vitamins E and C on the nutritional status. *German Medical Science* 7: 1–10.
- Jollow DJ, Mitchell JR, Zampaglione Z and Gillette JR (1974) Bromobenzene induced liver necrosis. Protective role of glutathione and evidence for 3, 4- bromobenzene oxide as the hepatotoxic metabolites. *Pharmacology* 11: 51–157.
- Jurczuk M, Brzóska MM and Moniuszko-Jakoniuk J (2007) Hepatic and renal concentrations of vitamins E and C in lead- and ethanol-exposed rats. An assessment of their involvement in the mechanisms of peroxidative damage. *Food and Chemical Toxicology* 45: 1478–1486.
- Kalender S, Ogutcu A, Uzunhisarcikli M, Acikgoz F, Durak D, Ulusoy Y, et al. (2005) Diazinon-induced hepatotoxicity and protective effect of vitamin E on some biochemical indices and ultrastructural changes. *Toxicology* 211: 197–206.
- Kalender S, Uzun FG, Durak D, Demir F and Kalender F (2010) Malathion-induced hepatotoxicity in rats: the effects of vitamins C and E. *Food and Chemical Toxicology* 48: 633–638.
- Kamboj A, Kiran R and Sandhir R (2006) Carbofuran-induced neurochemical and neurobehavioral alterations in rats: attenuation by N-acetylcysteine. *Experimental Brain Research* 170: 367–575.
- Karami-Mohajeri S, Abdollahi M (2011) Toxic influence of organophosphate, carbamate, and organochlorine pesticides on cellular metabolism of lipids, proteins, and carbohydrates: a systematic review. *Human and Experimental Toxicology* 30(9): 1119–1140.
- Lenton KJ, Sane AT, Theriault H, Cantin AM, Payette H and Wagner JR (2004) Vitamin C augments lymphocyte glutathione in subjects with ascorbate deficiency. *American Journal of Clinical Nutrition* 77: 189–195.
- Manawadi S, Kaliwal BB (2010) Methomyl-induced alteration in mice hepatic-oxidative status. *International Journal of Biotechnology Applications* 2(2): 11–19.
- Mansour SA, Mossa ATH and Heikal TM (2009) Effects of methomyl on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in rat erythrocytes: in vitro studies. *Toxicology and Industrial Health* 25(8): 557–563.
- Maran E, Fernandez M, Barbieri P, Font G and Ruiz MJ (2009) Effects of four carbamate compounds on antioxidant parameters. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72: 922–930.
- Marks AD, Lieberman M (2009) *Marks Basic Biochemistry: A Clinical Approach*. New York, NY: Lippincott Williams and Wilkins publication, pp. 439–442, 869–871.
- Messarah M, Amamra W, Boumendjel A, Barkat L, Bouasla I, Abdennour C, et al. (2012a) Ameliorating effects of curcumin and vitamin E on diazinon-induced oxidative damage in rat liver and erythrocytes. *Toxicol Indust Health*. Epub ahead of print 18 May 2012. DOI: 10.1177/0748233712446726.

- Messarrah M, Klibet F, Boumendjel A, Abdenmour C, Bouzerna N, Boulakoud MS, et al. (2012) Hepatoprotective role and antioxidant capacity of selenium on arsenic-induced liver injury in rats. *Experimental and Toxicologic Pathology* 64: 167–174.
- Ognjanovic BI, Markovic SD, Pavlovic SZ, Zikic RV and Stajin AS and Saicic (2008). Effect of chronic cadmium exposure on antioxidant defense system in some tissues of rats: protective effect of selenium. *Physiological Research* 57: 403–411.
- Oruç EÖ, Üner N (2000) Combined effects of 2,4-D and azinphosmethyl on antioxidant enzymes and lipid peroxidation in liver of *orochromis niloticus*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 127: 291–296.
- Rajesh MG, Latha MS (2004) Preliminary evaluations of the antihepatotoxic effect of Kamilari, a polyherbal formulation. *Journal of Ethnopharmacology* 91: 99–104.
- Rayman M (2004) The argument for increasing selenium intake. *Proceedings of the Nutrition Society* 61: 203–215.
- Radwan MA, Essawy AE, Abdelmeguid NE, Hamed SS, Ahmed AE (2008) Biochemical and histochemical studies on the digestive gland of *Eobania vermiculata* snails treated with carbamate pesticides. *Pestic Biochem Physiol* 90: 154–167.
- Rodwell EW (1979) *Review of Physiological Chemistry*. 17th ed. California: Lange Medical Publications, pp. 401–404.
- Saito Y, Takahashi K (2002) Characterization of selenoprotein P as a selenium supply protein. *European Journal of Biochemistry* 269: 5746–5751.
- Sankar P, Telang AG and Manimaran A (2010) Curcumin protects against cypermethrin-induced genotoxicity in rats. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 30(3): 289–291.
- Saoudi M, Messarrah M, Boumendjel A, Jamoussi K and El Feki A (2011) Protective effects of vitamin C against haematological and biochemical toxicity induced by deltamethrin in male Wistar rats. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74: 1765–1769.
- Sinhaseni P, Foongvidya S and Tayaputch N (1995) Exposure evaluation is a crucial step for quantitative risk assessment of methomyl. *Arhivza Higijenu Radai Toksikologiju* 46: 301–306.
- Thompson RW, Valentine HL and Valentine WM (2002) In vivo and in vitro hepatotoxicity and glutathione interactions of N-methylthiocarbamate and N, N-dimethylthiocarbamate in rat. *Toxicologic Science* 70: 269–280.
- Tsai MJ, Wu SN, Cheng HA, Wang SH and Chiang HT (2003) An outbreak of food-borne illness due to methomyl contamination. *Journal of Toxicology Clinical Toxicology* 41: 969–973.
- Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M and Mazur M (2006) Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions* 160(1): 1–40.
- Vanholder RC, De Smet RV and Ringoir SM (1992) Assessment of urea and other uremic markers for quantification of dialysis efficacy. *Clinical Chemistry* 38: 1429–1436.
- Verma RS, Mehta A and Srivastava N (2007) In vivo chlorpyrifos induced oxidative stress: attenuation by antioxidant vitamins. *Pesticide Biochemistry and Physics* 88: 191–196.
- Yousef MI (2004) Aluminium-induced changes in hematobiochemical parameters, lipid peroxidation and enzyme activities of male rabbits: protective role of ascorbic acid. *Toxicology* 199: 47–57.
- Yousef MI, Awad TI and Mohamed EH (2006) Deltamethrin-induced oxidative damage and biochemical alterations in rat and its attenuation by vitamin E. *Toxicology* 227(3): 240–247.
- Yousef MI, Demerdash FM, Kamei KI and Salhen KS (2003) Changes in some hematological and biochemical indices of rabbits induced by isoflavones and cypermethrin. *Toxicology* 189: 223–234.

Communications nationales

* **DJEFFAL Assia**, MESSARAH Mahfoud. (2011). Impact de l'administration de méthomyl ; carbamate insecticide sur la variation de certains paramètres biochimiques et hépatiques et sur le taux de malondialdéhyde chez le rat de la souche Wistar. 9^{ème} journée nationale de pharmacie, Batna, Algérie. p 67.

* **DJEFFAL Assia**, MESSARAH Mahfoud. (2011). L'effet toxique de l'administration d'un carbamate insecticide sur la variation de certains paramètres biochimiques et rénaux et sur la concentration en glutathion chez le rat de la souche Wistar. 3^{ème} Congrès de la société Algérienne de Biologie Clinique (SABC), Alger, Algérie. p 109.

* **DJEFFAL Assia**, BOUMENDJEL Amel, MESSARAH Mahfoud. (2011). Changes of lipid peroxidation and some oxidizing-stress parameters in methomyl-treated rat. 1^{er} Congrès International de Biotechnologie D'Annaba : Challenges & Perspectives de laboratoire de biotechnologie et développement de la sante, Annaba, Algérie.

Communications internationales

- * **DJEFFAL Assia**, AMAMRA Wahiba, MESSARAH Mahfoud. (2011). Impact de l'administration de méthomyl sur la variation de certains paramètres biochimiques et sur le taux de malondialdéhyde chez le rat de la souche wistar. 22^{ème} Forum International des Sciences Biologiques, de l'Association Tunisienne des Sciences Biologiques (ATSB), Mahdia, Tunisie. p 143.
- * **DJEFFAL Assia**, BOUMENDJEL Amel, MESSARAH Mahfoud. (2012). Rôle protecteur de vitamine C dans le stress oxydant induit par l'exposition au méthomyl au niveau du foie chez le rat de la souche wistar. 3^{èmes} journées Scientifiques de l'Association Tunisienne de Toxicologie (ATT) « Toxicologie-Environnement-Santé », Tabarka, Tunisie. p 77.
- * **DJEFFAL Assia**, KADECHE Lilia, BOUMENDJEL Amel, MESSARAH Mahfoud. (2012). Protective effect of ascorbic acid (vitamin C) on methomyl-induced hepatotoxicity in adult rats. 23^{ème} Forum International des Sciences Biologiques et de Biotechnologie de l'Association Tunisienne des Sciences Biologiques (ATSB), Hammamet, Tunisie. p 17.
- * **DJEFFAL Assia**, KADECHE Lilia, BOUMENDJEL Amel, MESSARAH Mahfoud. (2012). Protective effect of ascorbic acid (vitamin C) on methomyl-induced brain toxicity in adult rats. 22^{èmes} Journées Nationales de Biologie de la Société des Sciences Naturelle de Tunisie (SSNT), Hammamet, Tunisie. p 137.
- * **DJEFFAL Assia**, KADECHE Lilia, BOUMENDJEL Amel, MESSARAH Mahfoud. (2012). Effet protecteur de la vitamine C contre la néphrotoxicité induite par le méthomyl chez le rat de la souche wistar. 1^{er} Congrès International de l'Association Tunisienne de Physiologie et de Bio-surveillance de l'Environnement (ATP-BE), Douz, Tunisie. p 56-57.
- * **DJEFFAL Assia**, KADECHE Lilia, BOUMENDJEL Amel, MESSARAH Mahfoud. (2014). Protective effect of selenium as antioxidant on methomyl-induced brain oxidative stress in adult rats. Le 3^{ème} Congrès International sur les Molécules bioactives, Aliments fonctionnels et Maladies associées au stress oxydant de l'Association Tunisienne des Sciences de la Nutrition (ATSN), Hammamet, Tunisie. p 89.