

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLICUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



جامعة باجي مختار - عنابة
UNIVERSITE BADJI MOKHTAR - ANNABA



FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE

THÈSE

Présentée en vue de l'obtention
du diplôme de Doctorat en Biochimie

Option : Biochimie appliquée

Etude des effets préventifs de la supplémentation
en *Punica granatum* et/ou en acide gallique sur la
cytotoxicité induite par le fluorure de sodium chez le rat de
la souche wistar

Présentée par: M^{elle}BOUASLA Asma

Directeur de thèse : Mr. MESSARAH Mahfoud

Professeur, Université d'Annaba

Membres de Jury:

Président : Mr. KECHRID Zine

Professeur, Université d'Annaba

Examineur : Mr. LAALAOUI Korichi

Professeur, Université de Constantine -1

Examineur : Mr. DJABRI Belgacem

MCA, Université de Tébessa

Année universitaire : 2014 / 2015

REMERCIEMENTS

En premier lieu, je remercie Allah, le Tout Puissant, de m'avoir aidé durant toute ma vie, sans lui ce manuscrit n'aurait jamais pu voir le jour.



Avec beaucoup de gratitude j'adresse mon profond remerciement à mon directeur de thèse Mr Messarah M., professeur à l'université d'Annaba, qui a dirigé ce travail avec beaucoup de patience.



Je remercie infiniment Mr Kechrid Z., professeur à l'université d'Annaba, qui m'a fait l'honneur d'accepter de présider le jury de ma soutenance.

Mes remerciements vont à Mr Laalaoui K., professeur à l'université de Constantine 1, qui m'a fait l'honneur d'accepter de juger ce travail.

Je remercie également Mr Djabri B., maître de conférences "A" à l'université de Tébessa, qui a bien voulu examiner cette thèse.





Je resterai éternellement reconnaissante envers Dr. Khelfaoui M.S., maître assistant “ B ” à l’école supérieure d’enseignement technologique de Skikda, qui m’a aidé énormément.

Je tiens à exprimer mes plus vifs remerciements à mon collègue Dr. Barour C., maître de conférences “ B ” à l’université de Souk-Ahras pour son aide et sa disponibilité.

Je remercie aussi : Dr. Cheniki R. et Mr Mazegue S.



Mes remerciements vont également à mes amis : Laouar A. maître assistant “ A ” à l’université de Tébessa, Lekhouaguet A. maître assistant “ A ” à l’université de Souk-Ahras ainsi que Klibet F. maître assistant “ A ” à l’université de Constantine.

Ainsi qu’à l’ensemble des personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.



Table des Matières

Résumé	
Abstract	
المخلص	
Liste des tableaux.	
Liste des figures.	
Liste des abréviations.	
Introduction	01
Synthèse bibliographique	
Chapitre I : Fluorures	
I.1. Généralités.....	03
I.2. Sources d'exposition.....	04
I.3. Métabolisme.....	04
I.4. Fonctions biochimiques.....	04
I.5. Toxicité.....	05
I.6. Fluorures et stress oxydant.....	06
Chapitre II : Stress oxydant	
II. 1. Stress oxydant.....	08
II.2. Voies de production des espèces réactives de l'oxygène.....	09
II.2.1. Chaîne respiratoire mitochondriale	09
II.2.2. NADH oxydase.....	09
II.2.3. Xanthine oxydase.....	09
II.2.4. NO synthase.....	10
II.2.5. Ions métalliques.....	10
II.3. Dégâts oxydatifs cellulaires.....	10
II.3.1. Peroxydation lipidique.....	10
II.3.2. Oxydation des protéines.....	11
II.3.3. Oxydation des acides nucléiques.....	11
II.4. Systèmes de défense antioxydante.....	13
II.4.1. Systèmes antioxydants enzymatiques.....	13
II.4.1.1. Superoxyde dismutase	13
II.4.1.2. Catalase	13
II.4.1.3. Glutathion peroxydase	14
II.4.1.4. Glutathion S transférase	14
II.4.1.5. Autre enzymes antioxydantes.....	14
II.4.2. Systèmes antioxydants non enzymatiques.....	14
II.4.2.1. Vitamine E.....	14
II.4.2.2. Vitamine C.....	15
II.4.2.3. Glutathion réduit (GSH).....	15
II.4.2.4. Oligoéléments.....	16
II.5. Stress oxydant et pathologies.....	17
Chapitre III : <i>Punica granatum</i>	
III .1. Position systématique	18
III .2. Dénomination.....	18

III .3. Description botanique	18
III .4. Habitat et culture.....	20
III .5. Principaux constituants	20
III .6. Usage en phytothérapie	22

Chapitre IV : Acide gallique

IV .1. Généralités.....	24
IV .2. Biosynthèse.....	23
IV .3. Métabolisme.....	25
IV .4. Propriétés pharmacologiques.....	25

Etude expérimentale

Matériel et méthodes

1. Etude phytochimique	27
1.1. Matériel végétal	27
1.2. Teneur en flavonoïdes, en tanins et en polyphénols du jus <i>Punica granatum</i>	27
1.2.1. Dosage des flavonoïdes totaux	27
1.2.2. Dosage des tanins condensés	28
1.2.3. Dosage des polyphénols totaux.....	28
1.3. Evaluation du potentiel anti-radicalaire	31
1.3.1. Test de DPPH.....	31
1.3.2. Test de NBT/Riboflavine.....	32
2. Etude biologique.....	33
2.1. Animaux et régime.....	33
2.2. Traitement des rats	33
3. Sacrifices des rats et prélèvement des échantillons.....	35
3.1. Prélèvement sanguin.....	35
3.2. Prélèvement des organes	35
4. Détermination de la formule de numération sanguine (FNS).....	37
5. Techniques de dosage	37
5.1. Exploration de la fonction hépatique.....	37
5.1.1. Dosage du glucose	37
5.1.2. Dosage des protéines totales	38
5.1.3. Dosage d'albumine.....	39
5.1.4. Dosage de la bilirubine totale	40
5.1.5. Détermination de l'activité d'alanine aminotransférase (ALAT, EC 2.6.1.2).....	42
5.1.6. Détermination de l'activité d'aspartate aminotransférase (ASAT, EC 2.6.1.1)	43
5.1.7. Détermination de l'activité de la phosphatase alcaline (PAL, EC 3.1.3.1).....	44
5.1.8. Détermination de l'activité de la lactate déshydrogénase (LDH, EC 1.1.1.27).....	45
5.1.9. Détermination de l'activité de la créatine phosphokinase (CPK, EC 2.7.3.2)	46
5.2. Exploration du profil lipidique.....	48
5.2.1. Dosage du cholestérol	48
5.2.2. Dosage des triglycérides	49
5.2.3. Dosage du HDL-cholestérol	51
5.3. Exploration de la fonction rénale.....	52
5.3.1. Dosage de l'urée	52
5.3.2. Dosage de la créatinine	53
5.3.3. Dosage de l'acide urique	54

5.4. Dosage des hormones thyroïdiennes.....	56
5.5. Dosage de la testostérone.....	56
5.6. Dosage du fer	56
5.7. Exploration du stress oxydant	57
5.7.1. Préparation de l'homogénat	57
5.7.2. Dosage des protéines	57
5.7.3. Détermination du taux de glutathion réduit (GSH).....	59
5.7.4. Détermination du taux de la malondialdéhyde (MDA).....	60
5.7.5. Détermination de l'activité enzymatique du glutathion peroxydase (GPx) (E.C. 1.11.1.9).....	61
5.7.6. Détermination de l'activité enzymatique de la catalase (E.C.1.11.1.6).....	62
5.7.7. Détermination de l'activité enzymatique de la superoxyde dismutase (SOD) (E.C.1.15.1.1).....	63
6. Etude histologique	64
7. Traitement statistique des résultats	65

Résultats et discussion

Chapitre I : Activité antioxydante et teneur en composés phénoliques.....	66
I.1. Activité antioxydante.....	66
I.2. Teneur en composés phénoliques.....	66

Chapitre II : Impact du fluorure de sodium sur quelques paramètres physiologiques, hématologiques et effet protecteur de la suppléments en acide gallique et/ou le jus de <i>Punica granatum</i>.....	69
II. 1. Action sur le poids corporel.....	69
II.2. Actions sur le poids relatif des organes.....	69
II.3. Variation de la quantité d'aliment consommée.....	72
II.4. Variation de la quantité d'eau consommée	72
II.5. Variation des paramètres hématologiques.....	74
II.6. Effet sur la concentration en fer sérique (Fe).....	77

Chapitre III : Impact du fluorure de sodium sur la fonction hépatique et effet protecteur de la supplémentation en acide gallique et/ou le jus de <i>Punica granatum</i>..	82
III .1. Concentration plasmatique en glucose.....	82
III .2. Concentration plasmatique en protéines totales	82
III .3. Concentration plasmatique en albumine	82
III .4. Concentration plasmatique en bilirubine totale.....	82
III .5. Activité de l'aspartate aminotransférase (ASAT).....	85
III .6. Activité de l'alanine aminotransferase (ALAT).....	85
III .7. Activité des phosphatases alcalines (PAL).	85
III .8. Activité du lactate deshydrogénase (LDH)	85
III .9. Activité de la créatine phosphokinase (CPK)	85

Chapitre IV : Impact du fluorure de sodium sur le profile lipidique et effet protecteur de la suppléments en acide gallique et/ou le jus de <i>Punica granatum</i>.....	91
IV .1. Concentration plasmatique en cholestérol	91
IV .2. Concentration plasmatique en triglycérides	91
IV .3. Concentration plasmatique en HDL-cholestérol	91

IV .4. Concentration plasmatique en VLDL	91
Chapitre V : Impact du fluorure de sodium sur la fonction rénale et effet protecteur de la suppléments en acide gallique et/ou le jus de <i>Punica granatum</i>	96
V. 1. Concentration plasmatique en urée	96
V.2. Concentration plasmatique en créatinine	96
V.3. Concentration plasmatique en acide urique	96
Chapitre VI : Impact du fluorure de sodium sur la concentration des hormones thyroïdiennes et de la testostérone et effet protecteur de la suppléments en acide gallique et/ou le jus de <i>Punica granatum</i>	100
VI. 1. Concentration sérique en triiodothyronine (T ₃).....	100
VI.2. Concentration sérique en thyroxine (T ₄).....	100
VI.3. Concentration sérique en Testostérone	100
Chapitre VII : Stress oxydant induit par le fluorure de sodium et effet protecteur de la suppléments en acide gallique et/ou le jus de <i>Punica granatum</i>	105
VII. 1. Effet sur le taux du glutathion réduit (GSH).....	105
VII.2. Effet sur le taux du malaondialdehyde (MDA).....	105
VII.3. Effet sur l'activité de la glutathion peroxydase (GPx).....	110
VII.4. Effet sur l'activité de la Catalase (CAT).....	110
VII.5. Effet sur l'activité de la superoxide dismutase (SOD).....	115
Chapitre VIII : Impact du fluorure de sodium sur l'histologie et effet protecteur de la suppléments en acide gallique et/ou le jus de <i>Punica granatum</i>	121
VIII. 1. Etude histologique du foie.....	121
VIII.2. Etude histologique des reins.....	121
VIII.3. Etude histologique du cœur.....	121
VIII.4. Etude histologique des testicules.....	121
Conclusion et perspectives	128
Références bibliographiques	131

Résumé

Le présent travail consiste à analyser les effets du fluorure de sodium, administré dans l'eau de boisson à une dose de 100 ppm, sur la variation des paramètres physiologiques, hématologiques, biochimiques et sur le stress oxydant, d'une part, d'autre part de tester l'effet protecteur de l'acide gallique et du jus de *Punica granatum* sur la cytotoxicité induite par le fluorure de sodium chez le rat wistar.

Afin de déterminer le pouvoir antioxydant du jus de l'espèce locale (*Punica granatum*) une étude phytochimique préliminaire a été effectuée, initiée par une analyse quantitative des composés phénoliques et suivie par des testes anti-radicalaires. Les résultats obtenus révèlent la présence des taux variables des composés phénoliques dont les phénols totaux, les flavonoïdes et les tanins. Ils confirment également que le jus de cette espèce possède un pouvoir contre l'anion superoxyde et le radical DPPH.

L'étude expérimentale sur rats a été menée sur 36 mâles répartis en deux groupes : Groupe A (n=18) : traité par 1 ml d'eau distillée, Groupe B (n=18) : traité par 1 ml du jus de *Punica granatum*. Après cinq semaines les rats du groupe A ont été divisés en trois sous groupes : Sous groupe (Témoin) : rats témoins, Sous groupe (NaF) : traité par 100 ppm de fluorure de sodium, et le Sous groupe (NaF+AG) : traité par 100 ppm de fluorure de sodium plus 20mg/kg de l'acide gallique. Les rats du groupe B ont été également divisés en trois sous groupes : Sous groupe (NaF+PG) : traité par 100 ppm de fluorure de sodium plus 1ml du jus de *Punica granatum*. Sous groupe (NaF+AG+PG) : traité par 100 ppm de fluorure de sodium plus 20 mg/kg de l'acide gallique et 1 ml du jus de *Punica granatum*. Sous groupe (PG) : traité par 1 ml du jus de *Punica granatum*.

Les résultats obtenus après trois semaines de traitement ont montré chez le lot traité par le fluorure de sodium une augmentation des globules blanc (GB), une diminution des globules rouges (GR), du taux de l'hémoglobine (Hb) et de l'hématocrite (Ht) accompagnées d'une augmentation de l'activité enzymatique des transaminases (ASAT, ALAT), des phosphatases alcalines (PAL), des lactates déshydrogénases (LDH) ainsi que des créatines phosphokinases

(CPK) avec une diminution de la concentration plasmatique de l'albumine et des protéines totales. Ils montrent aussi une augmentation du taux de l'urée, la créatinine, de l'acide urique, du cholestérol et des triglycérides. De plus, nos résultats indiquent que l'administration du fluorure de sodium a induit un stress oxydant révélé par une diminution de la teneur en glutathion réduit (GSH) et de l'activité enzymatique de la glutathion peroxydase (GPx), de la catalase (CAT) et de la superoxyde dismutase (SOD). Nous avons démontré par la présente étude, une forte peroxydation lipidique, prouvée par l'augmentation de la teneur en malondialdéhyde (MDA) dans les globules rouges et dans tous les organes étudiés (foie, cœur, reins et testicules). Les modifications au niveau des paramètres du stress oxydant sont confirmées par les données histologiques où des changements extensifs dégénératifs et des infiltrations de cellules mononucléaires se sont manifestés, témoignant d'une inflammation.

Parallèlement, l'administration de l'acide gallique et/ou le jus de *Punica granatum* a amélioré les perturbations des paramètres hématologiques et biochimiques et a atténué l'intensité du stress oxydant induit par le fluorure de sodium.

Mots clés : Acide gallique, Antioxydant, Fluorure de sodium, *Punica granatum*, Rats, Stress oxydant.

Abstract

This work consists to analyse the effect of sodium fluoride administered in drinking water at a dose of 100 ppm, on the variation of physiological, hematological, biochemical parameters and on oxidative stress, in one hand, in other hand to test the protective effect of gallic acid and *Punica granatum* juice on the cytotoxicity induced by sodium fluoride in wistar rats.

In order to determinate the antioxydant potent of the local species's juice (*Punica granatum*), a preminilary phytochemical study was effected, initiated by quantitative analyse of phenolic componds and followed by anti-radicalars tests. The obtained results showed the presence of variable levels of phenolic componds (Total phenolic, flavonoides and tannins). They confirmed also that the juice of this species has a power against superoxyde anion and DPPH radical.

The experimental study was undertaken on 36 male rats divided on two groups: Group A (n=18): treated with 1 ml of distilled water, Group B (n=18): treated with 1 ml of *Punica granatum* juice. After five weeks, rats of groupe A were divided into three sub-groups: Sub-groupe (Control): control, Sub-group (NaF): treated with 100 ppm of sodium fluoride and the Sub-group (NaF+AG): treated with 100 ppm of sodium fluoride plus 20 mg/kg of gallic acid. Rats of group B were also divided into three sub-groups: sub-group (NaF+PG) treated with 100 ppm of sodium fluoride plus 1 ml of *Punica granatum* juice, Sub-group (NaF+AG+PG): treated with 100 ppm of sodium fluoride plus 20 mg/kg of gallic acid and 1ml of *Punica granatum* juice, Sub-group (PG): treated with 1 ml of *Punica granatum* juice.

The obtained results after three weeks of treatment showed in sodium fluoride treated group an increase in white blood cells (WC), a decrease in red blood cells (RC), hemoglobin (Hb), hematocrit (Ht) levels accompanied by an increase of enzymatic activities of transaminase (ASAT, ALAT), alkaline phosphatase (ALP), lactate dehydrogenase (LDH) and creatine phosphokinase (CPK), with a decrease of plasmatic concentration of total protein and

albumin. They showed also an increase of urea, creatinine, uric acid, cholesterol and triglycerides levels. Further, our results showed that the administration of sodium fluoride induced oxidative stress revealed by a decrease in reduced glutathione (GSH) levels and enzymatic activity of glutathione peroxidase (GPx), catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD). We have demonstrated by the present study a high lipid peroxidation, proved by increasing content of malondialdehyde (MDA) in red blood cells and all studied organs (liver, heart, kidney, testis). The changes in oxidative stress parameters are confirmed by histological data, where extensive degenerative changes and mononuclear cells infiltrations appear, testifying an inflammation.

In parallel, the administration of gallic acid and/or *Punica granatum* juice improved disturbance of hematological and biochemical parameters and has attenuated intensity of oxidative stress induced by sodium fluoride.

Key words : Gallic acid, Antioxidant, Sodium fluoride, *Punica granatum*, Rats, Oxidative stress.

الملخص

يهدف هذا العمل إلى دراسة تأثير فليوريد الصوديوم المنحل في مياه الشرب بجرعة قدرها 100 ppm على تغير المؤشرات الفيزيولوجية، الدموية، البيوكيميائية و على الإجهاد التأكسدي من جهة، و من جهة أخرى اختبار الدور الوقائي لكل من حمض الغاليك و عصير *Punica granatum* في حالات التسمم الخلوي الناجمة عن فليوريد الصوديوم عند الجرذان من سلالة وستار.

من أجل تحديد النشاط المضاد للأكسدة للنوع المحلي (*Punica granatum*) أجريت دراسة فيتوكيميائية مبدئية، بدأت بتحليل كمي للمكونات الفينولية، تلتها إختبارات القدرة على اسر الجذور الحرة. النتائج المتحصل عليها توضح وجود كميات مختلفة من المركبات الفينولية (الفينولات الكلية، الفلافونيدات و العفص). كما بينت أيضا أن لعصير هذا النوع القدرة ضد ايون سوبر اوكسيد و الجذر DPPH.

أجريت الدراسة التجريبية على 36 جرذ تم تقسيمهم الى مجموعتين: المجموعة A (18 جرذ): عولجت ب 1 ملل من الماء المقطر، المجموعة B (18 جرذ) : عولجت ب 1 ملل من عصير *Punica granatum* . بعد خمس أسابيع قسم جرذان المجموعة A إلى ثلاث مجموعات : المجموعة (Témoin) شاهد، المجموعة (NaF) عولجت ب 100 ppm من فليوريد الصوديوم و المجموعة (NaF+AG) عولجت ب 100ppm من فليوريد الصوديوم+20 ملغ/كغ من حمض الغاليك. كما قسمت المجموعة B أيضا الى ثلاث مجموعات: المجموعة (NaF+ PG) عولجت ب 100ppm من فليوريد الصوديوم+1ملل من عصير *Punica granatum*، المجموعة (NaF+AG+PG) عولجت ب 100ppm من فليوريد الصوديوم+1ملل من عصير *Punica granatum*+20ملغ/كغ من حمض الغاليك .

بينت النتائج المتحصل عليها بعد ثلاثة أسابيع عند المجموعة المعالجة بفليوريد الصوديوم إرتفاع عدد الكريات البيضاء (GB)، إنخفاض في كل من عدد الكريات الحمراء (GR) ، نسبة الهيموغلوبين (Hb) و الهيماتوكريت (Ht)، مرفوقا بزيادة النشاط الأنزيمي لناقلات الأمين (ALAT , ASAT)، الفسفاطاز القلوي (PAL) اللاكتات ديزيدروجيناز (LDH) و الكرياتينين فوسفوكيناز (CPK) مع انخفاض التركيز البلازمي للألبومين و البروتين. كما توضح النتائج أيضا ارتفاع تركيز اليوريا، الكرياتينين، حمض اليوريك، الكوليسترول و الغليسيريديت الثلاثية. بالإضافة إلى ذلك تبين النتائج التي تحصلنا عليها أن المعالجة بفليوريد الصوديوم تؤدي إلى إجهاد تأكسدي يتضح من خلال نقصان كمية الغلوتاثيون المرجع (GSH) و انخفاض النشاط الأنزيمي لكل من الغلوتاثيون بيروكسيداز (GPx) ، الكاتالاز (CAT) و السوبر اكسيد دسيميوتاز (SOD). اثبتنا في هذه الدراسة ارتفاع نسبة المالوندي الدهيد (MDA) و هذا على مستوى الكريات الحمراء و جميع الأعضاء المدروسة (الكبد، القلب، الكلية و الخصية). أكدت البيانات النسيجية تغيرات واسعة الانتشار مرفوقة بتسلل وحيدات النواة ، الأمر الذي يشير إلى حدوث التهابات.

بالمقابل حسنت المعالجة بحمض الغاليك و/أو عصير *Punica granatum* اضطرابات المؤشرات الدموية و البيوكيميائية كما حدث من شدة الإجهاد التأكسدي الناتج عن فليوريد الصوديوم.

الكلمات الدالة: حمض الغاليك، مضاد الأكسدة، فليوريد الصوديوم، جردان، الإجهاد التأكسدي، *Punica granatum*

Liste des Tableaux

Tableau 01: Composition de l'alimentation pour 1 kilogramme d'aliment.....	33
Tableau 02: Activité antioxydante et teneur en phénols totaux (mg AG/g), flavonoïdes (mg Qerc/g) et tanins (mg Catch/g) du jus de <i>Punica ganatum</i>	66
Tableau 03: Variation du poids corporel (g) et du poids relatif (g/100g de poids corporel) des organes (foie, reins, cœur et testicules) chez les rats témoins et les rats traités.....	70
Tableau 04 : Variation de la quantité d'aliment (g/rat/jour) et de la quantité d'eau (ml/rat/jour) consommées ainsi que la quantité d'NaF ingérée (mg/rat/jour) chez les rats témoins et les rats traités.....	72
Tableau 05 : Variation du nombre des globules rouges ($\times 10^6 /\mu\text{l}$) et des globules blanc ($\times 10^3 /\mu\text{l}$), du VGM (fl), et du taux de l'hémoglobine (g/dl) et de l'hématocrite (%) chez les rats témoins et les rats traités.....	75
Tableau 06 : Variation de la CCMH (g/dl), de la TCMH (pg), des plaquettes et du fer sérique ($\mu\text{g/dl}$) chez les rats témoins et les rats traités	78
Tableau 07 : Variation de la concentration plasmatique du glucose (mg/dl), des protéines totales (g/dl), de l'albumine (g/dl) et de la bilirubine totale (mg/dl) chez les rats témoins et les rats traités.....	83
Tableau 08 : Variation de l'activité enzymatique (U/l) des transaminases (ASAT, ALAT) des phosphatases alcalines (PAL), de la lactate déshydrogénase (LDH) et de la créatine phosphokinase (CPK) chez les rats témoins et traités.....	86
Tableau 09 : Variation de la concentration plasmatique (mg/dl) : du cholestérol, des triglycérides, de l'HDL et des VLDL chez les rats témoins et les rats traités.....	92
Tableau 10: Variation de la concentration plasmatique (en mg/dl) de : l'urée, la créatinine et de l'acide urique chez les rats témoins et les rats traités.....	97
Tableau 11 : Variation de la concentration sérique (ng/ml) de la T_3 , T_4 et de la testostérone chez les rats témoins et les rats traités.....	101

Tableau 12 : Variation de la teneur en glutathion réduit (GSH) (nmol/mg protéines) dans : le foie, les reins, le cœur, les testicules et les globules rouges (GR) chez les rats témoins et les rats traités.....	106
Tableau 13 : Variation de la teneur en malaondialdehyde (MDA) (nmol/mg protéines) dans : le foie, les reins, le cœur, les testicules et les globules rouges (GR) chez les rats témoins et les rats traités.....	108
Tableau 14 : Variation de l'activité enzymatique de la glutathion peroxydase (GPx) (nmol GSH/min/ mg protéines) dans : le foie, les reins, le cœur, les testicules et les globules rouges (GR) chez les rats témoins et les rats traités.....	111
Tableau 15 : Variation de l'activité enzymatique de la catalase (CAT) ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ dégrader/min/mg de protéines) dans : le foie, les reins, le cœur, les testicules et les globules rouges (GR) chez les rats témoins et les rats traités.....	113
Tableau 16 : Variation de l'activité enzymatique de la superoxide dismutase (SOD) (U/mg de protéines) dans : le foie, les reins, le cœur, les testicules et les globules rouges (GR) chez les rats témoins et les rats traités.....	115

Liste des Figures

Figure 01 : Classification des fluorures.....	03
Figure 02 : Dommages induits par les fluorures.....	07
Figure 03 : Mécanisme en chaîne de la peroxydation des acides gras polyinsaturés et nature des produits terminaux formés	12
Figure 04 : Lésions de l'ADN formées par attaque radicalaire.....	12
Figure 05 : Répartition des principales défenses antioxydantes dans la cellule.....	16
Figure 06 : <i>Punica granatum</i>	19
Figure 07 : Structure de quelques composés de <i>Punica granatum</i>	21
Figure 08 : Structure de l'acide gallique.....	23
Figure 09 : Biosynthèse de l'acide gallique.....	24
Figure 10 : Courbe d'étalonnage de la quercétine	30
Figure 11 : Courbe d'étalonnage de la catéchine	30
Figure 12 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique	30
Figure 13 : Schéma récapitulatif du protocole expérimental.....	36
Figure 14 : Courbe d'étalonnage de la BSA	58
Figure 15 : Variation du poids relatif (g/100g de poids corporel) des organes (foie, reins et testicules) chez les rats témoins et les rats traités.....	71
Figure 16 : Variation de la quantité d'aliment (g/rat/jour) et de la quantité d'eau (ml/rat/jour) consommées chez les rats témoins et les rats traités.....	73
Figure 17 : Variation du nombre des globules rouges ($\times 10^6$ / μ l) et des globules blanc ($\times 10^3$ / μ l), du VGM (fl), et du taux de l'hémoglobine (g/dl) et de l'hématocrite (%) chez les rats témoins et les rats traités.....	76
Figure 18 : Variation de la CCMH (g/dl), de la TCMH (pg), des plaquettes et du fer sérique (μ g/dl) chez les rats témoins et les rats traités.....	79
Figure 19 : Variation de la concentration plasmatique du glucose (mg/dl), des protéines totales (g/dl), de l'albumine (g/dl) et de la bilirubine totale (mg/dl) chez les rats témoins et les rats traités.....	84

Figure 20 : Variation de l'activité enzymatique (U/l) des transaminases (ASAT, ALAT) des phosphatases alcalines (PAL), de la lactate déshydrogénase (LDH) et de la créatine phosphokinase (CPK) chez les rats témoins et les rats traités.....	87
Figure 21 : Variation de la concentration plasmatique (mg/dl) : du cholestérol, des triglycérides, de l'HDL et des VLDL chez les rats témoins et les rats traités.....	93
Figure 22 : Variation de la concentration plasmatique (en mg/dl) de : l'urée, la créatinine et de l'acide urique chez les rats témoins et les rats traités.....	98
Figure 23 : Variation de la concentration sérique (ng/ml) de la triodothyronine, thyroxine et de la testostérone chez les rats témoins et les rats traités.....	102
Figure 24 : Variation de la teneur en glutathion réduit (GSH) (nmol/mg protéines) dans : le foie, les reins, le cœur, les testicules et les globules rouges (GR) chez les rats témoins et les rats traités.....	107
Figure 25 : Variation de la teneur en malaondialdéhyde (MDA) (nmol/mg protéines) dans : le foie, les reins, le cœur, les testicules et les globules rouges (GR) chez les rats témoins et les rats traités.....	109
Figure 26 : Variation de l'activité enzymatique de la glutathion peroxydase (GPx) (nmol GSH/min/ mg protéines) dans : le foie, les reins, le cœur, les testicules et les globules rouges (GR) chez les rats témoins et les rats traités.....	112
Figure 27 : Variation de l'activité enzymatique de la catalase (CAT) ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ dégrader/min/mg de protéines) dans : le foie, les reins, le cœur, les testicules et les globules rouge (GR) chez les rats témoins et les rats traités.....	114
Figure 28 : Variation de l'activité enzymatique de la superoxide dismutase (SOD) (U/mg de protéines) dans : le foie, les reins, le cœur, les testicules et les globules rouges (GR) chez les rats témoins et les rats traités.....	116
Figure 29 : Coupes histologiques du foie (EH×400): (A) Témoin, (B) NaF, (C) NaF+AG, (D) NaF+PG, (E) NaF+AG+PG, (F) PG.....	122
Figure 30 : Coupes histologiques des reins (EH×400): (A) Témoin, (B) NaF, (C) NaF+AG, (D) NaF+PG, (E) NaF+AG+PG, (F) PG.....	123
Figure 31 : Coupes histologiques du cœur (EH×400): (A) Témoin, (B) NaF, (C) NaF+AG, (D) NaF+PG, (E) NaF+AG+PG, (F) PG.....	124
Figure 32 : Coupes histologiques des testicules (EH×400): (A) Témoin, (B) NaF, (C) NaF+AG, (D) NaF+PG, (E) NaF+AG+PG, (F) PG.....	125

Liste des Abréviations

AGE : Equivalents d'acide gallique.

AlCl₃ : Trichlorure d'aluminium

BHT: Butyl-hydroxy-toluène

BSA : Sérum albumine bovine.

CDNB : 1-chloro, 2,4-dinitrobenzène.

CE : Equivalents de catéchine.

DL₅₀ : Dose létal qui tue 50% d'une population.

DNTB : Acide 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoïque) ou réactif d'Ellman.

DO: Densité optique

DPPH : 2,2-diphényle-1-picrylhydrazyle.

EDTA : Ethylène diamine tétra-acétique.

ERO : Espèces Oxygénées Activées.

HCl: Acid chloridrique

IC₅₀: Concentration inhibitrice a 50%

LOOH : Hydroxyde lipidique.

LOO: Radical peroxyde

LPO : les peroxydes lipidiques.

NaCl: Chlorure de sodium

NADP : Nicotinamide adénine di nucléotide phosphate.

NADPH: Nicotinamide dinucléotide phosphate.

NBT: Nitrobleu tetrazolium

PM: poids moléculaire.

QE: Equivalents de quercétine .

TBA: 2-Thiobarbituric acid: L'acide thiobarbiturique

TCA : Trichloroacétique.

U : Unité enzymatique.

Unités

°C : Degré Celsius.

dl : Décilitre.

g : Gramme.

g/l : Gramme/litre.

l : Litre.

mg: Milligramme.

mg/dl : Milligramme/ décilitre.

min: Minute.

mol: Mole

ng/mg: Nanogramme/milligramme

U/L: Unité internationale/ litre.

µl : Microlitre.

INTRODUCTION

Introduction

Le fluore est un élément qui n'existe pas libre dans la nature, en raison de sa très grande réactivité. Il est universellement répandu dans la croûte terrestre et dans notre environnement sous forme de fluorures minéraux et organiques. La teneur en fluorures augmente dans les régions où sont implantées les briqueteries, les usines de production de fibres de verre, d'élaboration de fer, d'acier et d'aluminium, d'un autre côté cette teneur augmente à cause du traitement par les phosphates fertilisants, ou de l'usage d'engrais chimiques et d'herbicides. Les fluorures de sodium sont les éléments majeurs et incontournables des formulations des produits pour soins dentaires et buccaux. Il s'agit d'une des méthodes les plus simples et les moins onéreuses pour lutter efficacement contre la formation des caries dentaires (UNEP/WHO, 1993 ; Machalinski *et al.*, 2000 ; Ibrahim *et al.*, 2013).

En plus de ses effets bénéfiques bien connus sur le squelette et la dentition, des effets toxiques peuvent résulter de l'ingestion excessive de fluor. La toxicité des fluorures inorganiques a été ignorée pendant longtemps. Cependant, ces dernières années plusieurs études ont montré que les fluorures inorganiques et même à des faibles doses, peuvent provoquer des perturbations endocriniennes, biochimiques et hématopoïétiques. En outre, il a été démontré que le fluorure, aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*, provoque une génération accrue de radicaux libres à l'origine d'un stress oxydant (Ri-An *et al.*, 2006).

Dans les systèmes biologiques, le stress oxydant se définit comme un déséquilibre de la balance redox qui peut être due à une production accrue d'espèces réactives de l'oxygène (ERO), une diminution des défenses anti-oxydantes ou une association des deux (Bonfont-Rousselot, 2007). Les dommages liés à un stress oxydant se traduit par diverses altérations biochimiques intracellulaires telles que l'oxydation de l'ADN, des protéines ou encore la peroxydation des lipides. De ce fait, il est impliqué dans de très nombreuses maladies comme facteur déclenchant ou associé à des complications de l'évolution. Des études tant épidémiologiques que cliniques indiquent que les antioxydants jouent un rôle clé dans la

diminution du risque de développer plusieurs pathologies dont le diabète et le cancer. Sur la base de ces données, les scientifiques accordent de plus en plus d'importance à la prise d'antioxydant afin d'assurer une protection anti-radicalaire (**Beaudeaux et Durand, 2011**).

Actuellement, il est bien reconnu que le monde végétal constitue une source potentielle de molécules naturelles susceptibles d'avoir des effets antioxydants. Le grenadier (*Punica granatum*) est arbuste de la famille des Punicaceae, il est cultivé non seulement dans le bassin méditerranéen mais jusqu'en Asie orientale. Le jus de son fruit a été utilisé depuis longtemps en phytothérapie empirique. Cette utilisation traditionnelle a fait l'objet ces dernières années de plusieurs travaux de recherche. Les résultats des différentes études scientifiques menées *in vitro* et/ou *in vivo* ont montré que ce jus est particulièrement riche en polyphénols antioxydants et qu'il pourrait avoir une activité anti-inflammatoire, cardio-protective et même anti-tumorale (**Lim, 2013**).

L'acide gallique (l'acide 3,4,5 trihydroxybenzoïque) est un produit naturel largement répandu dans les plantes. Plusieurs études réalisées récemment ont permis de démontrer l'intérêt de l'acide gallique dans la protection contre les radicaux libres. Les travaux effectués ces dernières années sur modèle animal ou sur cultures cellulaires ont montré également une activité cytotoxique sélective contre les cellules cancéreuses (**Singh et al., 2004 ; Bhourri et al., 2012**).

Au vu de ces données, nous nous sommes intéressés dans ce travail à l'étude de l'effet antioxydant du jus de *Punica granatum* ainsi que celui de l'acide gallique sur un stress oxydant induit par le fluorure de sodium chez le rat Wistar. Cette étude est articulée sur deux parties. Dans la première nous avons essayé d'abord de donner une idée sur les fluorures, le stress oxydant, l'acide gallique ainsi que sur l'espèce botanique choisie pour cette étude (*Punica granatum*). Alors qu'on a consacré la deuxième partie à l'étude expérimentale sur rats afin de déterminer :

- L'impact du fluorure de sodium sur les paramètres hématologiques et biochimiques ainsi que sur les biomarqueurs du stress oxydant et l'histologie de certains organes (foie, cœur, reins et testicules).
- L'effet protecteur potentiel du traitement par l'acide gallique et/ ou le jus de *Punica granatum* sur la toxicité induite par le fluorure de sodium.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I

FLUORURES

CHAPITRE I : FLUORURES

I.1. Généralités

D'un point de vue chimique, le fluor est un élément de symbole F, de numéro atomique ($Z=9$) et de masse atomique ($A_r=18.98$). C'est le métalloïde le plus électronégatif de la famille des halogènes, ce qui lui confère une réactivité chimique telle qu'on ne le rencontre jamais à l'état libre, mais sous la forme d'ions fluorures minéraux ou organiques (Figure 01) (Chapuis, 1991 ; Ramade, 2000; Desfontaines, 2002 ; Martini et Seiller, 2006).

L'utilisation des fluorures est depuis longtemps reconnue comme une véritable mesure de santé publique. La forte affinité des ions fluorures avec les tissus calcifiés et en particulier les dents et le tissu osseux, est à la base de leur intérêt en médecine (Chapuis, 1991).

Le fluorure de sodium (NaF) est un sel neutre formé par l'association de fluor et de sodium. Ce sel permet la libération rapide et complète de l'ion fluor à cause de sa très grande solubilité dans l'eau. Pour des raisons de coût et d'efficacité le fluorure de sodium fait partie aujourd'hui des sels les plus souvent retrouvés dans les pâtes dentifrices (Martini et Seiller, 2006).

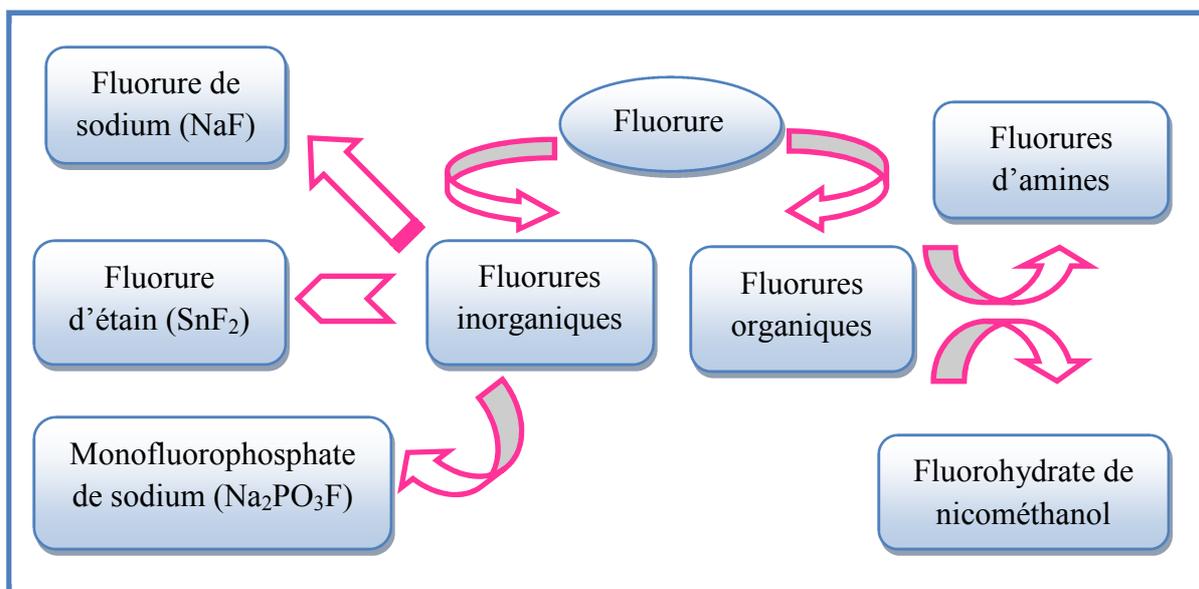


Figure 01 : Classification des fluorures (Chapuis, 1991).

I.2. Sources d'expositions

Les sources d'exposition aux fluorures sont multiples, elles peuvent être d'origine alimentaire (l'eau potable, les céréales transformés, les jus de fruits, les boissons gazeuses, les poissons et les fruits de mer) ou médicamenteuse (les produits dentaires essentiellement les dentifrices et les bains de bouche, les anesthésions comme l'enflurane, isoflurane et le sevoflurane). En plus, l'exploitation des fluorures dans la fabrication du verre, de l'aluminium et des pesticides, constitue une autre source d'exposition et de pollution du sol et de l'air atmosphérique (**Chapuis, 1991 ; Martini et Seiller, 2006**).

I.3. Métabolisme

Dans les conditions normales, le NaF est absorbé passivement par voie gastro-intestinale cette absorption est rapide avec un pic plasmatique en 30 minutes mais diminuée par la présence du calcium et d'aluminium. En présence de pollution fluorée atmosphérique, le NaF est absorbé par voie pulmonaire (**Hodge et Smith, 1981 ; Ekstrand, 1983**). Dans le plasma des sujets normaux la concentration des fluorures est inférieure à 19 µg/l. lorsque l'apport en fluorure de sodium augmente la fluorémie augmente également. Donc, les fluorures absorbés se trouvent dans le plasma à des concentrations proportionnelles aux apports mais un processus de régulation se met en place pour ramener le taux à sa valeur initiale. Plus de 98% du fluorure de l'organisme s'accumule sous forme de fluor-apatite dans le tissu osseux qui a la plus grande affinité (**Chapuis, 1991**). L'élimination du fluorure est essentiellement rénale, elle se fait par filtration glomérulaire suivie d'une réabsorption tubulaire pH dépendante (**Desfontaines, 2002**).

I.4. Fonctions biochimiques

Plusieurs expériences sur animaux donnent à penser que les fluorures ont plusieurs fonctions biochimiques qui se superposent et se complètent. L'action des fluorures peut se décomposer en :

- La prévention de la carie dentaire où ils permettent une réduction de 30 à 60% des caries sur la dentine temporaire, de 15 à 35 % sur la dentine permanente et de 40% des caries radicalaires à l'âge de 75 ans.
- Les effets inhibiteurs de la déminéralisation ainsi que les effets promoteurs de la minéralisation de l'émail dentaire (**Desfontaines, 2002 ; Viola et Botta, 2005**).

- L'importante participation dans la synthèse du collagène et des glycosaminoglycanes du système vasculaire.
- L'effet inhibiteur sur le métabolisme bactérien (**Martini et Seiller, 2006**).

D'après l'étude de **Schwartz et Milne (1972)**, les faibles apports en fluorures peuvent provoquer un retard de la croissance. Ils peuvent également abaisser l'espérance de vie (**Anke et al., 1991**).

I.5. Toxicité

Les fluorures sont susceptibles d'induire plusieurs effets toxiques qui peuvent être observés chez les végétaux, les animaux ainsi que chez les humains.

- **Toxicité végétale**

Elle dépend de l'importance et la durée de la contamination fluorée. L'absorption se fait à partir des sols par diffusion passive, les particules absorbées se déposent en partie sur les parties aériennes de la plante. L'accumulation de dérivés fluorés chez les plantes est une source de contamination animale (**Chappuis, 1991**).

- **Toxicité animale**

Chez le bétail, la source de l'intoxication est alimentaire par consommation de fourrage contaminé ou d'eau à concentration excessive en fluorures. Les symptômes observés sont dus essentiellement à l'accumulation fluorée au niveau des dents et du squelette. Chez les animaux du laboratoire, l'intoxication par ingestion ou injection de fluorure de sodium cause des symptômes peu spécifiques (importants troubles gastro-intestinaux, fibrillation musculaire et dépression cardio-respiratoire). Les DL_{50} sont variables selon les espèces et le mode d'administration (**Chappuis, 1991**).

- **Toxicité humaine**

Bien que l'utilisation des fluorures aux doses recommandées (0.05 mg/kg/jour) ne présente aucune sorte d'effets indésirables, comme tout agent actifs, les ions fluorures possèdent une toxicité à la fois aigue et chronique (**Barbier et al., 2010**).

L'intoxication aiguë par les fluorures est exceptionnelle, elle est associée dans la majorité des cas à des ingestions suicidaires ou accidentelles de produits contenant des fluorures. Les premières manifestations de l'intoxication aiguë sont les troubles gastro-intestinaux, cardiovasculaires ainsi que les atteintes musculaires et les crises convulsives. Elles apparaissent après ingestion de 140 à 210 mg de fluorures (F⁻). Pour une personne qui pèse 70 kg la dose létale serait 5 à 10 g de fluorures (F⁻) (**Jacpuot, 1964 ; Frejaville *et al.*, 1981 ; Chappuis, 1991**).

La véritable toxicité des fluorures est une toxicité chronique qui résulte de l'ingestion prolongée de petites doses. Cette toxicité se manifeste par des opacités des dents qui caractérisent la fluorose dentaire et qui résulte d'une hypominéralisation de l'émail et de la dentine. La fluorose osseuse et une autre conséquence de l'exposition chronique aux fluorures, elle se caractérise par un épaissement osseux et une calcification des tissus mous, ligaments, tendons, membranes et attaches (**Chappuis, 1991 ; O.M.S., 1997**).

I.6. Fluorures et stress oxydant

Il est bien connu que la toxicité des fluorures est due à leur capacité d'induire un stress oxydant. Les dommages oxydatifs observés après exposition aux fluorures sont provoqués essentiellement par une hyperproduction des radicaux libres d'un côté, et une diminution de l'efficacité du système de défense anti-radicalaire de l'autre côté (**Zhang et Ji, 1996**).

Plusieurs études ont prouvé que l'exposition aux fluorures augmente la génération des anions superoxyde, de l'oxyde nitrique, du peroxyde d'hydrogène ainsi que les peroxynitrites. D'autres études ont montré que les fluorures inhibent l'activité de plusieurs enzymes antioxydantes tel que la superoxyde dismutase, la glutathion peroxydase et la catalase, de plus ils peuvent diminuer le taux du glutathion réduit (**Nabavi *et al.*, 2013**).

L'étude de **Lee *et al.*, (2008)** a montré que le fluorure de sodium peut altérer la fonction mitochondriale et diminue ainsi la respiration cellulaire par l'augmentation de la libération du cytochrome C de la mitochondrie vers le cytosol, ce qui provoque l'induction de la cascade des caspases induisant l'apoptose (Figure 02)

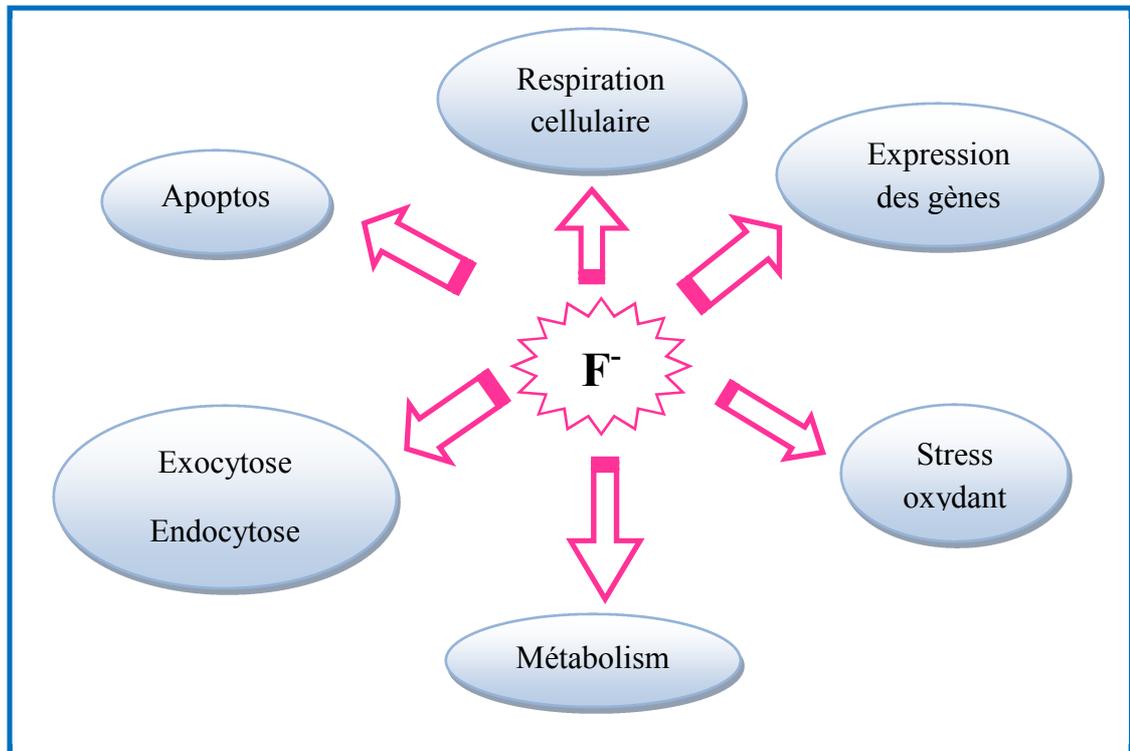


Figure 02 : Dommages induits par les fluorures (Barbier et *al.*, 2010).

CHAPITRE II
STRESS OKYDANT

CHAPITRE II : STRESS OXYDANT

II.1. Stress oxydant

Le stress oxydant est communément défini comme un déséquilibre profond entre la production des espèces réactives de l'oxygène (ERO) et les systèmes de défense anti-oxydants au profit des premiers (**Bonnefont-Rousselot *et al.*, 2002 ; Barouki, 2006**). Cette situation peut résulter d'un dysfonctionnement endogène (alimentation pauvre en antioxydants) ou être d'origine exogène (exposition à des facteurs pro-oxydants) (**Goudable et Favier, 1997 ; Pincelmail *et al.*, 2002**). Les ERO regroupent les radicaux libres oxygénés (radical superoxyde O_2^- , radical hydroxyl $^{\cdot}OH$, monoxyde d'azote NO^{\cdot} ...etc.) et certains dérivés oxygénés non radicalaires dont la toxicité est importante (peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , peroxydinitrite ONOO) (**Fontaine *et al.*, 2002**).

Un radical libre est une espèce chimique (molécule ou atome) contenant un ou plusieurs électrons (non appariés) sur une orbitale externe. Cela lui confère une grande réactivité donc une demi vie très courte (**Goudable et Favier 1997, Bonnefont-Rousselot *et al.*, 2002 ; Fontaine *et al.*, 2002**). Ce déséquilibre n'est que transitoire car il est comblé soit par l'acceptation d'un autre électron, soit par le transfert de cet électron libre sur une autre molécule. Parmi les espèces radicalaires susceptibles de se former dans les cellules, il convient de distinguer celles dites "primaire" qui dérivent de l'oxygène par des réducteurs à un électron tels l'anion superoxyde (O_2^-), radical hydroxyl ($^{\cdot}OH$) et le monoxyde d'azote (NO^{\cdot}). Les autres radicaux libres dits "secondaire", se forment par réaction des radicaux primaires sur les composés biochimiques de la cellule (**Favier, 2003**).

Certains radicaux formés chez les être vivants tels que l'anion superoxyde (O_2^-) et monoxyde d'azote (NO^{\cdot}) ne sont pas très réactifs ce qui permet leur utilisation par l'organisme comme médiateurs régulant des fonctions biologiques telles la vasodilatation capillaire, la prolifération ou le message des neurones. En revanche des radicaux comme les pyroxyles (ROO^{\cdot}) ou surtout le radical hydroxyle ($^{\cdot}OH$) sont extrêmement réactifs avec la plus part des molécules des tissus vivants (**Favier, 2003**).

II.2. Voies de production des espèces réactives de l'oxygène

Les voies majoritaires de production des ERO sont sous la dépendance de divers systèmes.

II.2.1. Chaîne respiratoire mitochondriale

La mitochondrie est considérée comme l'une des principales sources des ERO dans la cellule, par le fonctionnement de chaîne respiratoire (constituée d'un ensemble de transporteurs d'électrons) au niveau de laquelle a lieu une réduction contrôlée de l'oxygène (O_2) aboutissant à la formation d'eau (H_2O) (par la cytochrome oxydase). Cependant, ce système peut laisser fuir quelques électrons qui vont réduire l'oxygène partiellement.

Ainsi 2 à 3 % de l'oxygène subit une réduction monovalente conduisant à la formation du radical superoxyde (O_2^-). Lorsque la génération d'oxygène (O_2) est augmentée ou lorsque les systèmes anti-oxydants sont dépletés, l' H_2O_2 peut s'accumuler et entraîner un stress oxydatif mitochondrial. Dans cette situation, l' H_2O_2 peut réagir avec le fer et produire des ions hydroxyles ($^{\cdot}OH$) (Bonnefont-Rousselot *et al.*, 2002, Bonnefont-Rousselot *et al.*, 2003).

II.2.2. NADPH oxydase

La NADPH oxydase est une enzyme membranaire initialement décrite dans les cellules phagocytaires, à l'origine de la production des radicaux superoxydes (O_2^-). Cette production de superoxyde est à l'origine de la production d'autres molécules comme peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou l'hypochlorite (ClO^-) indispensable à la destruction du matériel phagocyté. Cette voie de production de dérivés réactifs de l'oxygène est particulièrement stimulée au cours des processus infectieux et participe certainement au stress oxydatif pouvant compliquer ces états (Fontaine *et al.*, 2002, Beaudoux *et al.*, 2006).

II. 2.3. Xanthine oxydase

La xanthine oxydase (XO) est une source importante de radicaux libres. Elle transforme l'hypoxanthine en xanthine puis en acide urique, produisant au cours de chacune de ces deux réactions un anion superoxyde. La production des ERO par la xanthine oxydase est principalement basale, mais jouerait un rôle important lors de l'ischémie (Fontaine *et al.*, 2002 ; Berry et Hare, 2004 ; Fontaine, 2007).

II. 2.4. NO synthase

Les NO-synthases (NOSs) sont une famille d'enzymes qui représente l'unique source de NO⁻ chez les mammifères. Elles ont toutes la même structure et elles sont actives sous forme de dimères, chaque monomère étant constitué d'un domaine réductase et d'un domaine oxygénase (**Bredt et al., 1990_(a); Bredt et al., 1990_(b); Luis et al. 2004**).

Chez les mammifères, trois isoformes principales de NOS ont été isolées : la NOS endothéliale (eNOS), la NOS neuronale (nNOS) et la NOS inductible des macrophages (iNOS) (**John et al., 1997 ; Fischmann et al., 1999**).

L'activité principale des NOSs est la biosynthèse de NO⁻, suivant deux étapes successives de mono-oxygénation. La première étape transforme le substrat L-arginine en l'intermédiaire N ω -hydroxy-L-arginine (NOHA) ; la seconde étape transforme NOHA en L-citrulline avec libération d'une molécule de NO (**John et al. 1997**).

II. 2.5. Ions métalliques

Certains ions métalliques comme le fer et le cuivre sont de remarquables promoteurs de processus radicalaire *in vitro* ; ils transforment le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) en radical hydroxyle ([•]OH) encore plus toxique, et accélèrent la peroxydation lipidique. En situation physiologique, la concentration libre du fer ou du cuivre est particulièrement basse, ces deux métaux étant séquestrés par des protéines spécialisées, de sorte que cette réaction n'a pas lieu. En revanche la destruction cellulaire entraînent la libération de ces métaux et par conséquence un stress oxydatif (**Fontaine et al., 2002, Fontaine, 2007**).

II. 3. Dégâts oxydatifs cellulaires

II. 3.1. Peroxydation lipidique

Les lipides et principalement les acides gras polyinsaturés sont la cible privilégiée de l'attaque radicalaire surtout par le radical hydroxyl ([•]OH).

La peroxydation lipidique est une réaction en chaîne qui comporte trois étapes qui débute par l'attaque d'un radical libre entraînant l'abstraction d'un hydrogène situé sur un groupement méthylène (-CH₂-) entre deux double liaisons pour former un radical diène conjugué (R[•]). Ce dernier en présence d'oxygène, il sera oxydé en radical peroxy (RO₂[•]) qui se transforme en hydroperoxyde (ROOH) au contact d'un autre acide gras (Figure 03).

Les hydroperoxydes peuvent être réduits et neutralisés par la glutathion peroxydase et la vitamine E ou continuer à s'oxyder et se transformer en aldéhydes toxiques dont le malondialdéhyde (MDA) et l'hydroxynonéal (**Bonnefont Rouselot *et al.*, 2003 ; Favier, 2003**).

II. 3.2. Oxydation des protéines

Aujourd'hui, il est prouvé que les protéines aussi peuvent être la cible des réactions d'oxydations. Ces réactions sont fréquemment influencées par les cations métalliques comme le cuivre et le fer et provoquent l'introduction d'un groupement carbonyle dans la protéine. On distingue deux catégories des réactions d'oxydation des protéines : celles qui cassent les liaisons peptidiques et modifient la chaîne peptidique d'une part, et d'autre part, les modifications des peptides par addition de produits issus de la peroxydation lipidique. Ces modifications conduisent généralement à une perte de la fonction catalytique ou de la structure des protéines affectées (**Leuvine, 2002**).

II. 3.3. Oxydation des acides nucléiques

Les espèces réactives de l'oxygène peuvent attaquer directement les deux types de l'ADN. Ces attaques provoquent : des coupures simples et doubles brin, des pontages ADN-protéine, des formations de site abasique ainsi que des modifications des bases elles mêmes. Des dommages indirects de l'ADN peuvent également résulter de l'attaque des aldéhydes réactifs issus de la peroxydation lipidique (Figure 04) (**Favier, 2003**).

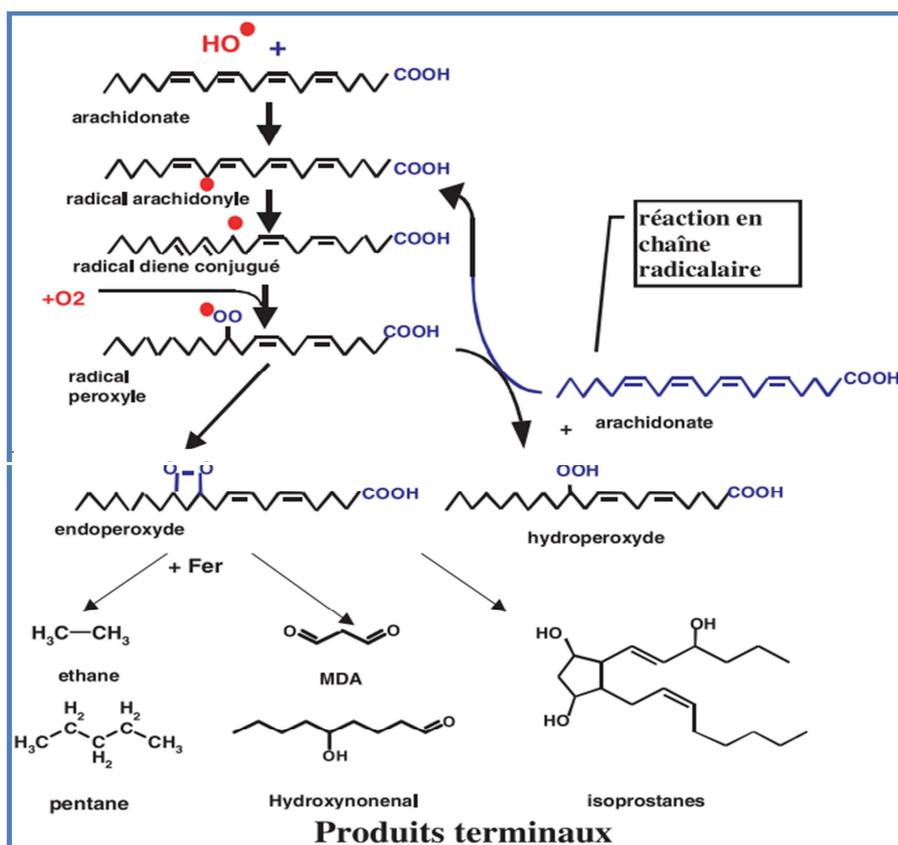


Figure 03: Mécanisme en chaîne de la peroxydation des acides gras polyinsaturés et nature des produits terminaux formés (Favier, 2003).

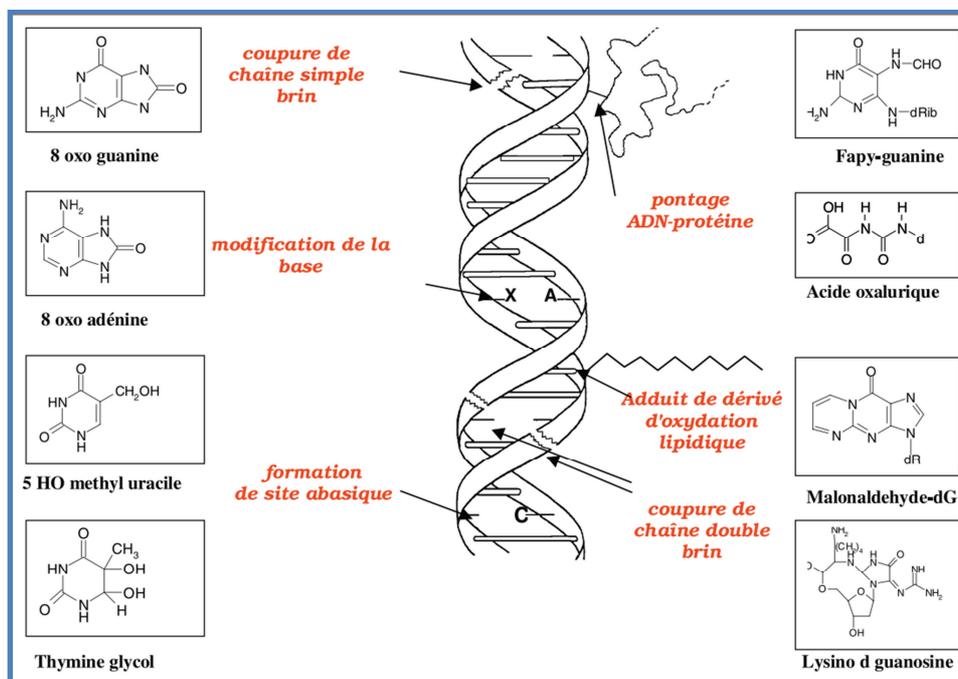


Figure 04 : Lésions de l'ADN formées par attaque radicalaire (Favier, 2003).

II.4. Systèmes de défense antioxydante

Le maintien d'un niveau non cytotoxique des ERO est assuré par des systèmes antioxydants. Un antioxydant peut être défini comme toute substance qui, présente à faible concentration par rapport au substrat oxydable, est capable de ralentir ou d'inhiber l'oxydation de ce substrat. Les systèmes de défense antioxydants peuvent être enzymatiques ou non enzymatiques (**Fontaine *et al.*, 2002**).

II.4.1. Systèmes antioxydants enzymatiques

Pour lutter contre un excès de production des ERO, l'organisme dispose d'un arsenal important d'enzymes antioxydantes ubiquitaires, les principales sont : la superoxyde dismutase, la catalase, la glutathion peroxydase et la glutathion S transférase. Plus récemment d'autre enzyme ayant des propriétés antioxydantes ont été révélées.

II.4.1.1. Superoxyde dismutase

Les superoxydes dismutase (SODs) permettent d'éliminer les radicaux superoxydes par dismutation du radical superoxyde (O_2^-) en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et en oxygène (O_2) selon la réaction suivante :



Chez l'Homme trois isoformes de l'enzyme SOD ont été caractérisées : la Cu/Zn-SOD ou SOD1 et la EC-SOD ou SOD3 ; ces deux formes utilisent le cuivre et le zinc comme cofacteurs nécessaire à l'activité enzymatique, alors que la Mn-SOD ou SOD2 mitochondriale utilise le manganèse (**Johnson et Giulivi, 2005 ; McCord et Edeas, 2005 ; Afonso *et al.*, 2007**).

II. 4.1.2. Catalase

Les catalases (CATs) sont des enzymes très répandus dans un grand nombre de tissus, elles sont capables de transformer le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire, particulièrement abondantes dans les globules rouges et les peroxysomes hépatiques. Ce sont des enzymes tétramériques, chaque unité portant un groupement hémunique (avec un Fe^{3+} lié au site actif) et une molécule de NADPH (**Matés *et al.*, 1999 ; Bonnefont-Rousselot *et al.*, 2003 ; Reichel *et al.*, 2004**).



II. 4.1.3. Glutathion peroxydase

Les glutathion peroxydases (GPx) sont aussi l'un des systèmes de défense anti-radicalaires. Ces enzymes ont une structure tétramérique comportant un atome de sélénium dans chaque sous-unité, intégré dans le site actif sous forme de sélénocystéine. Les glutathion peroxydases existent dans le cytosol (cGPx), dans le plasma (pGPx) et au niveau de la membrane cellulaire (HPGPx). Elles sont capable de réduire le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et d'autre hydroxydes organiques toxiques (ROOH) formés par oxydation des acides gras ou du cholestérol, en couplant la réduction de l'hydroxyperoxyde avec un substrat réducteur (**Goudable et favier, 1997 ; Bonnefont-Rousselot *et al.*, 2003 ; favier, 2003**).



II.4.1.4. Glutathion S transférase

Les glutathion S transférases (GSTs) représentent une importante famille d'enzymes qui jouent un rôle important dans la détoxification des composés endogènes ainsi que des xénobiotiques (**Nebert et Vasiliou, 2004**). Les GSTs catalysent la conjugaison entre le GSH et une large variété de composés électrophiles. Chez l'humain on distingue deux super famille de GSTs : cytosoliques (divisées en six classes : Alpha (α), Mu (μ), Oméga(ω), Pi (π), Theta(θ) et Zeta (ζ)) et microsomaux (jouent un rôle clé dans le métabolisme des leukotriènes et des prostaglandines) (**Townsend *et al.*, 2003**).

II. 4.1.5. Autre enzymes antioxydantes

Il existe de nombreuses autres enzymes antioxydantes comme l'hème oxygénase et les thioredoxines réductases ou les thioredoxines peroxydases. Ces enzymes ont été découvertes récemment et font l'objet de nombreux travaux concernant leurs fonctions antioxydantes. La plupart de ces enzymes, de même que les enzymes de réparation des dommages oxydants, utilisent un donneur d'équivalent réducteur, le NADPH, qui constitue avec le glutathion les facteurs indispensable à la défense antioxydante (**Kim *et al.*, 2001**).

II. 4.2. Systèmes antioxydants non enzymatiques

II. 4.2.1. Vitamine E

L'appellation vitamine E regroupe un ensemble de composés phénoliques appelés tocophérols (α, β, γ, δ). Ils diffèrent les uns des autres par le nombre et la position des groupes méthylés sur le cycle aromatique. C'est α tocophérol qui est biologiquement le plus actif.

Le caractère hydrophobe de la vitamine E lui permet de s'insérer dans la membrane cellulaire riche en acides gras polyinsaturés, très sensibles à l'oxydation. Cette dernière donne lieu à des réactions en chaînes induisant la formation de radicaux lipoperoxyde (LOO^\cdot) très réactif. La vitamine E est capable de bloquer ces réactions en cédant un hydrogène phénolique au radical peroxyde (LOO^\cdot) pour le transformer en hydroperoxyde stable (LOOH).



Au cours de cette réaction, le tocophérol (TocOH) est transformé en radical tocophéryl (TocO^\cdot). Ce dernier est pris en charge par d'autres antioxydants dont plus particulièrement la vitamine C qui le régénère en vitamine E (**Pincelmail *et al.*, 1996; Khalil, 2002 ; Martini et Seiller, 2006**).

II. 4.2.2. Vitamine C

La vitamine C ou l'acide ascorbique est un antioxydant hydrosoluble, indispensable au fonctionnement de l'organisme. Elle intervient dans certains processus métaboliques et joue un rôle important dans la protection des cellules des dommages radicalaires. En effet, c'est un excellent piègeur des radicaux superoxydes et hydroxyle (**Martini et Seiller, 2006**).

Lors de son oxydation en acide déhydroascorbique, elle passe par la forme radicalaire intermédiaire (radical ascorbyl) qui joue un rôle essentiel dans la régénération de la vitamine E (**Chen *et al.*, 2000**).

Elle est régénérée par les ascorbates réductase et maintenue sous sa forme réduite par l'action de la déshydrogénase réductase qui utilise le GSH comme co-facteur (**Berlier et Heineche, 1996**).

II.4.2.3. Glutathion réduit (GSH)

Il s'agit d'un tripeptide formé par la condensation de l'acide glutamique, de la cystéine et de la glycine ; il existe en équilibre entre la forme réduite (GSH) et la forme oxydée (GSSH) (**Townsend *et al.*, 2003**).

Le glutathion sous forme réduite est l'antioxydant majeur des cellules, les protégeant notamment des radicaux libres et de plusieurs xénobiotiques (Figure 05). Il réagit avec le radical hydroxyle, superoxyde, le peroxyde d'hydrogène et le monoxyde d'azote. Il joue aussi le rôle de cofacteur de toute une série d'enzymes antioxydantes (glutathion peroxydases,

glutathion réductase, thiorédoxines et peroxyrédoxines) (Wu *et al.*, 2003 ; Defraigne et Pincemail, 2007 ; Koji *et al.*, 2008).

II. 4.2.4. Oligoéléments

Les oligo-éléments, autrement appelés “ éléments traces ” sont des catalyseurs biologiques indispensables au fonctionnement harmonieux des systèmes enzymatiques, ils interviennent comme co-facteurs d’enzymes indispensables dans la lutte contre les radicaux libres. Par exemple, le zinc, le sélénium et le fer interviennent dans l'activité de divers systèmes enzymatiques protecteurs (superoxyde dismutase, glutathion peroxydase, catalase respectivement) qui accélèrent la transformation des radicaux libres et des peroxydes lipidiques en métabolites non toxiques.

Des apports insuffisants en oligoéléments antioxydants seraient ainsi susceptibles de réduire les capacités de défense de l'organisme contre les agressions des dérivés actifs de l'oxygène qui pourraient être impliquées dans les processus cellulaires jouant un rôle dans le déterminisme du développement de certaines pathologies (Bonfont-Rousselot, 2007 ; Galan *et al.*, 1997).

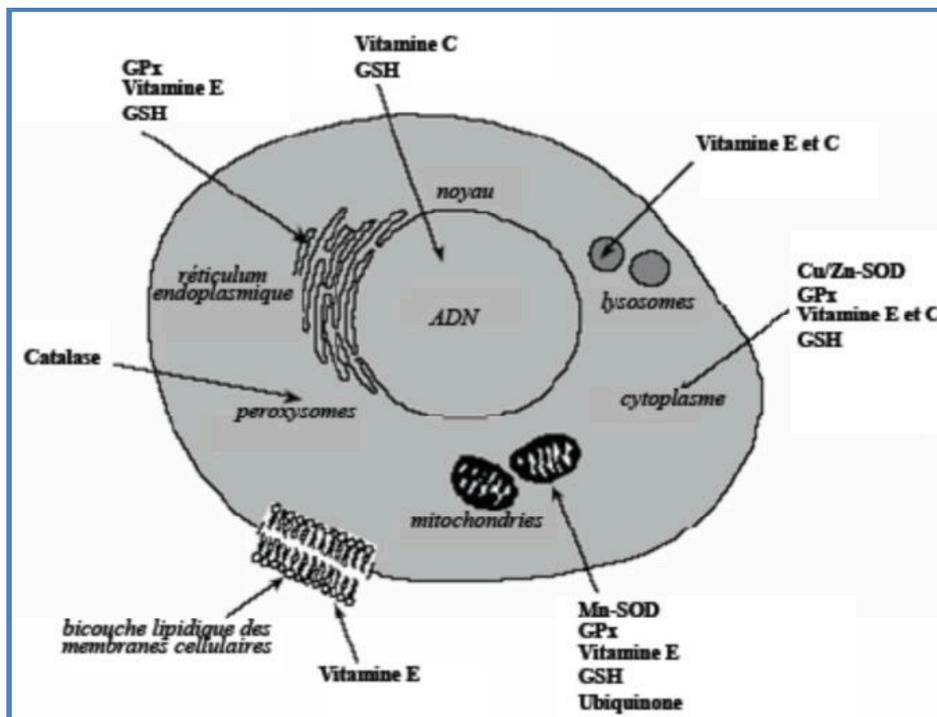


Figure 05 : Répartition des principales défenses antioxydantes dans la cellule (Garait, 2006).

II. 5. Stress oxydant et pathologies

Le stress oxydant est impliqué dans développement de très nombreuses maladies comme facteur déclenchant ou associé à des complications de l'évolution. En effet, plusieurs travaux indiquent que le stress oxydant est l'un des facteurs potentialisant l'apparition des pathologies plurifactorielles comme le diabète, les maladies cardiovasculaires, les rhumatismes et même le cancer (**Montagnier *et al.*, 1998 ; Pincemail *et al.*, 2002**).

En parallèle d'autres études ont montré qu'une alimentation riche en antioxydants est clairement associée avec une diminution significative des dommages radicalaires.

Les scientifiques accordent que les causes essentielles du stress oxydant sont soit d'origines nutritionnelle dans le cas des carences en vitamines et oligo-éléments, ou inversement de surcharges en facteurs prooxydants (fer, acides gras), soit d'origine accidentelle (inflammation, exposition à des xénobiotiques prooxydants...etc), soit d'origine génétique. Le plus souvent, l'association de ces différents facteurs aboutira au mécanisme pathogène (**Favier, 2003**).

CHAPITRE III
Punica granatum

CHAPITRE III : *Punica granatum*

III. 1. Position systématique (Bross, 2000 ; Ait Youssef, 2006).



III. 2. Dénomination

En français, on l'appelle le grenadier et ses noms vernaculaires sont nombreux : baloustier, miouganier, baloufier.

Dans la littérature internationale, on le trouve sous les noms : pomegranate en anglais, granatbaum en allemand et granata en italien. Il est appelé arummân ou jullanâr en arabe.

De point de vue étymologique le nom grenade dérive du latin granatum du granum et signifie : pourvu de nombreuses graines ; la grenade se nommait déjà en latin Malum granatum (fruit garni de graines). On l'appelait aussi : Malum punicum (fruit ou pomme carthaginoise) d'où son nom en latin botanique (Fournier, 1999 ; Boullard, 2001 ; Ait Youssef, 2006).

III. 3. Description botanique

Le grenadier est un arbuste de 2 à 5 mètres de hauteur, à rameaux grêles anguleux et légèrement épineux. Les feuilles dont la longueur peut atteindre 3 à 8 cm, sont opposées et caduques, glabre, de forme oblongue à pétiole très court. Elles sont luisantes et de couleur verte foncée.

Les fleurs qui s'épanouissent entre juin à septembre, sont disposées au sommet des rameaux, elles sont soit solitaires, soit groupées par 2 ou 3. Elles sont grandes (de 2 à 2.5 cm de diamètre), à calice coriace et de couleur rouge orangée, comprenant 5 à 7 lobes d'où sort la corolle formée de 5 à 7 pétales. Les étamines sont nombreuses et jaunes (Figure 06) (Bézanger *et al.*, 1980 ; Burine, 1997; Beloued, 1998).

Le fruit (grenade) est couronné par la partie supérieure du calice ; il s'agit d'une baie volumineuse, dont la forme globuleuse est contractée vers son extrémité, cette baie est cortiquée et sa pulpe est rougeâtre. Il est formé par la coalescence de huit carpelles : cinq à la partie supérieure et trois à la partie inférieure, renfermant chacun plusieurs graines comestibles au tégument charnu, sucré et succulent (Fournier, 1999; Brosse, 2000 ; Boullard, 2001; More et white, 2005; Ait Youssef, 2006).

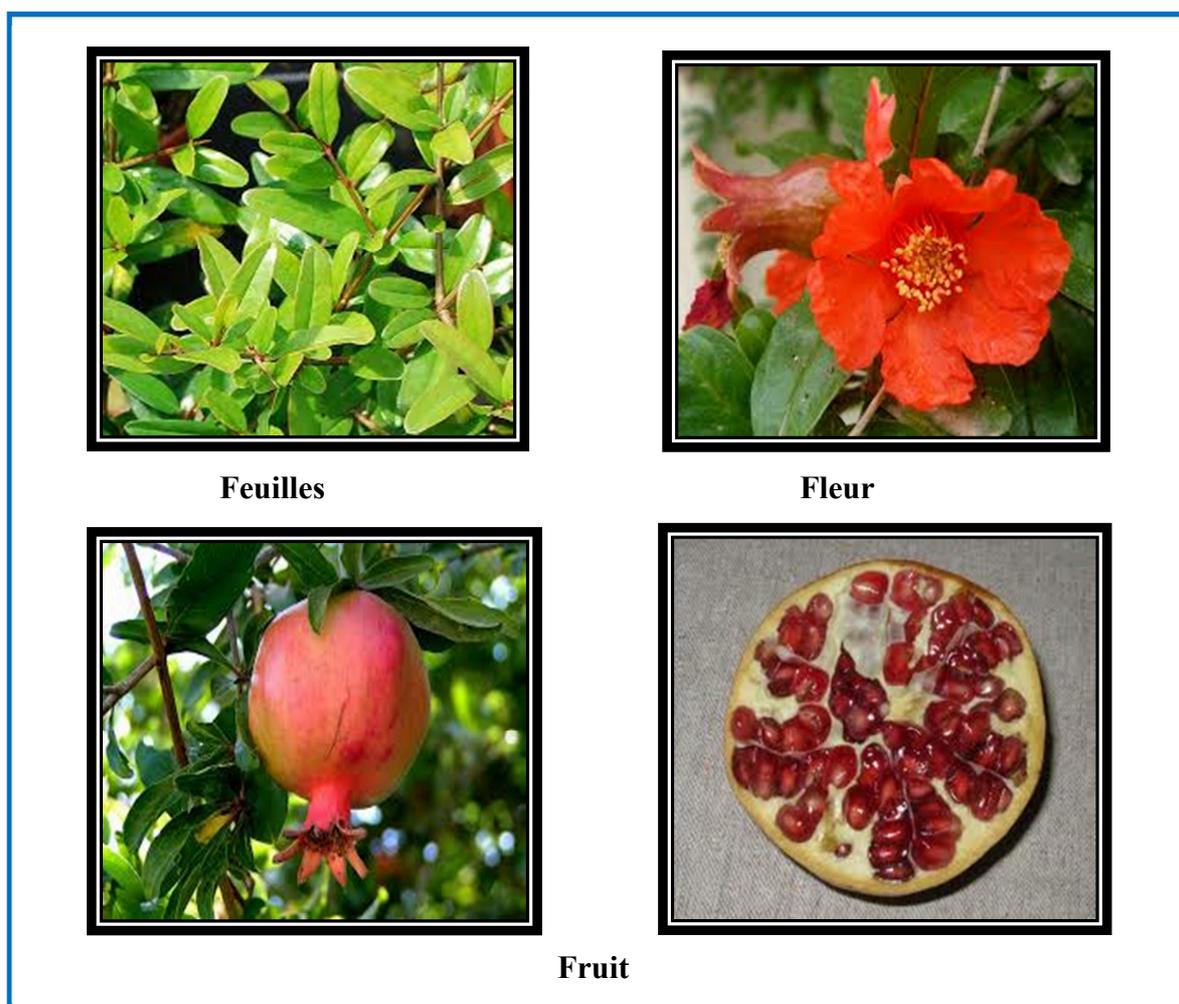


Figure 06 : *Punica granatum* (photos personnelles : prises par l'auteur).

III. 4. Habitat et culture

Le grenadier commun est depuis si longtemps répandu par la culture non seulement autour du bassin méditerranéen, mais jusqu'en Asie orientale, qu'on a quelque peine à retracer son origine. Les recherches des botanistes sont finalement parvenues à déterminer le biotope naturel de l'espèce : ce sont les terrains rocaillieux et chauds de l'Asie occidentale, autour de la Caspienne, au sud du Caucase et de l'Iran à l'Afghanistan et au Pendjab. C'est à partir de là que l'espèce s'est répandue, d'une part à l'ouest vers la méditerranée orientale et l'Afrique du Nord, d'autre part à l'est vers l'Inde et la Chine. Elle est aujourd'hui cultivée jusqu'au sud des Etats Unies et en Amérique du Sud (**Bézanger *et al.*, 1980 ; Burine, 1997 ; Beloued, 1998 ; Fournier, 1999 ; Brosse, 2000 ; Boullard, 2001 ; More et white, 2005**). En Algérie cette espèce est cultivée partout et surtout dans le Tell. En majorité rustique le *Punica granatum* préfère un sol profond bien drainé. La multiplication de cette espèce se fait par bouturage en été (**Burine, 1997 ; Beloued, 2001**).

III. 5. Principaux constituants

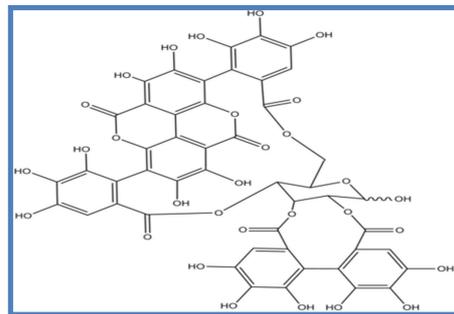
L'écorce de la racine contient 0.5 à 0.7 % d'alcaloïdes (la pelletiérine ou punicine, l'isopelletiérine, la méthylpeltiérine et la pseudopeltiérine). Elle contient également environ 22 à 28 % de tanins (l'acide digallique, l'acide ellagique et l'acide punitannique), 3 à 20% de substances minérales, des oxalates, des matières résineuses, de la mannite et une substance amère (la granatine).

Dans les feuilles on trouve les tanins et les flavones (comprenant lutéolines et apigénine). Alors qu'on trouve dans les fleurs l'acide gallique, acide ursolique et les triterpènes (**Bézanger, 1980 ; Burine, 1997 ; Beloued, 1998 ; Fournier, 1999 ; Brosse, 2000 ; Boullard, 2001 ; Ait Youssef, 2006**).

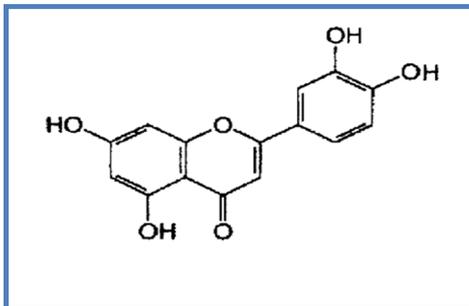
L'écorce du fruit est riche en tannins, elle ne contient pas d'alcaloïdes est donc à priori dépourvue de toxicité. Le péricarpe de la grenade contient des punicalagines, des anthocyanidines, des flavonols, des flavones, des flavonones, des acides gras ainsi que de l'acide gallique (Figure 07).

Le jus du fruit est riche en polyphénols antioxydants, en particulier en antocyanines, en flavonoides (falavanols) et en ellagitanins (punicalagine et puniacortéines).

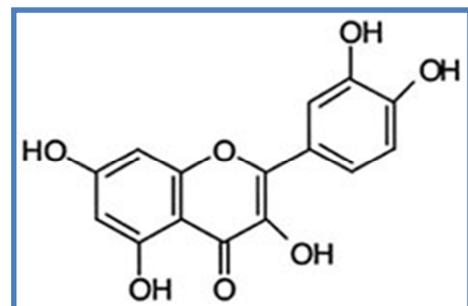
Il contient 75 à 78 % d'eau, 10 à 12 % de sucre, 1 à 2 % de matières grasses, 1.3 à 1.6 % d'acides aminés, 2.6 à 2.8 % de matières fibreuses et des acides citriques et maliques. On trouve également l'acide gallique, l'acide caféique, la catéchine, la quercétine, de nombreux minéraux (calcium, magnésium, potassium et cuivre) et de bonnes quantités de la vitamine C, B₅, B₆ et B₉. Il est aussi l'une des sources végétales les plus riches en dérivés d'œstrogènes (Bézanger, 1980 ; Fournier, 1999 ; Bruneton, 2009 ; Debjit *et al.*, 2013 ; Tezcan *et al.*, 2013 ; Mphahlele *et al.*, 2014).



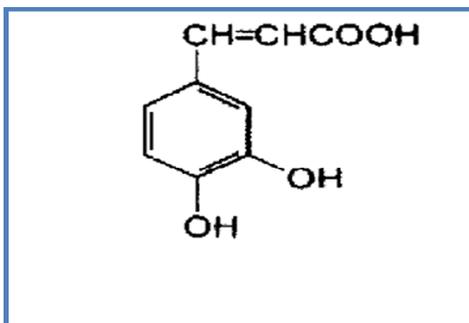
Punicalagine



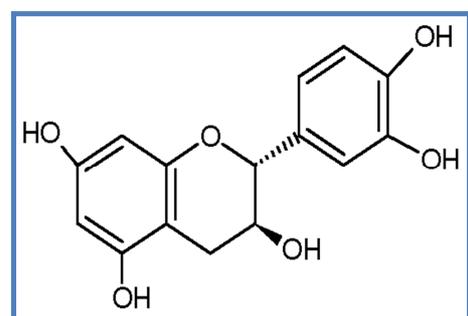
Lutéoline



Quercétine



Acide caféique



Catéchine

Figure 07 : Structure de quelques composés de *Punica granatum* (Lansky *et al.*, 2005_a).

III. 6. Usage en phytothérapie

L'utilisation de cette espèce pour ses propriétés médicinales est très ancienne. En effet, depuis l'antiquité, l'infusé ou le décocté des feuilles et des fleurs fraîches ou sèches étaient utilisées pour traiter les saignements du nez, le manque d'appétit, les nausées, la faiblesse générale, l'anémie, les courbatures, la migraine et les diarrhées chroniques (**Das et al., 1999**).

L'écorce du fruit était également employée en usage interne sous forme de poudre ou de décocté dans les maladies gastro-intestinales. Une étude récente a prouvé que l'extrait de l'écorce de la grenade possède une activité inhibitrice des ulcères de l'estomac induit par l'aspirine et l'éthanol (**Ajaikumar et al., 2005**). **Murphy et al., (2004)** ont montré aussi que les préparations à base d'extrait de l'écorce permet une bonne cicatrisation, nettement visible par examen histopathologique des blessures des rats Wistar.

Depuis quelques années, le jus de grenade attire l'attention des scientifiques en tant qu'agent protecteur contre différents types de cancers et des maladies cardiovasculaires en particulier l'athérosclérose (**Debjit et al., 2013**).

Une étude réalisée sur des promyélocytes humains de leucémie (HL-60) montre que le jus de la grenade inhibe de manière significative, la prolifération des cellules cancéreuses (**Kawaii et Lansky, 2004**). Quatre espèces chimiques pures, toutes présentes dans la grenade, l'acide ellagique, l'acide caféique, la lutéoline et l'acide punicique, ont été testées en tant qu'inhibiteurs de la croissance *in vitro* de cellules cancéreuses humaines de prostate (PC-3) (**Lansky et al., 2005 b**). **Seeram et al., (2005)** ont, par ailleurs, montré que le jus de grenade a une forte activité antiproliférative sur des lignées cellulaires de cancer du côlon.

D'autres études ont prouvé que l'administration chronique de jus de grenade peut contrer les effets proathérogènes. En effet, une étude menée sur des sujets athérosclérotiques a montré que la consommation du jus de grenade pendant trois ans réduit le risque athérogène (**Aviram et al., 2004**). Il est récemment prouvé que la supplémentation en jus de grenade a un effet neuroprotecteurs dans le cas d'ischémie et de la maladie d'Alzheimer (**Loren et al., 2005 ; Ahmed et al., 2014**). Il a été montré aussi que ce jus possède une activité antimicrobienne et même antivirale (**Neurath et al., 2004 ; Mansourian et al., 2014**). Ces effets bénéfiques du jus de grenade sont probablement dus aux propriétés antioxydantes des polyphénols très abondants dans ce jus (**Aviran et al., 2004**).

CHAPITRE IV
ACIDE GALLIQUE

CHAPITRE IV : ACIDE GALLIQUE

IV. 1. Généralités

L'acide gallique (acide 3, 4, 5-trihydroxybenzoïque) est un composé organique aromatique, largement répandu dans les plantes soit sous forme libre soit comme composant des gallotanins.

Il est classé dans les acides phénoliques puisqu'il comporte à la fois une fonction carboxylique et des hydroxyles phénoliques. Et comme il est dérivé de l'acide benzoïque, on le classe aussi dans les acides hydroxy-benzoïques (Figure 08) (De Beer *et al.*, 2003).

On le trouve à l'état naturel dans les noix de galle, les feuilles de thé, l'écorce de chêne, entre autres plantes. Sa formule chimique est $C_6H_2(OH)_3COOH$. Les sels et esters tirés de cet acide sont appelés les gallates (Singh *et al.*, 2004).

L'acide gallique de synthèse, se présente sous la forme d'une poudre cristalline blanche ou jaune pâle, inodore, de saveur astringente et acide. Sa masse moléculaire est de 170.12 g/mol, alors que son point de fusion est de 250°C. Il est soluble dans le méthanol, éthanol, l'eau et l'acétate d'éthyle.

Il peut être tiré facilement des tanins. Il s'obtient par hydrolyse des gallotanins avec de l'acide sulfurique. Ces gallotanins (ou tanins galliques) sont formés autour d'un sucre (glucose ou polyol) comportant plusieurs liaisons esters avec des acides galliques ou leurs dérivés (Polewski *et al.*, 2002).

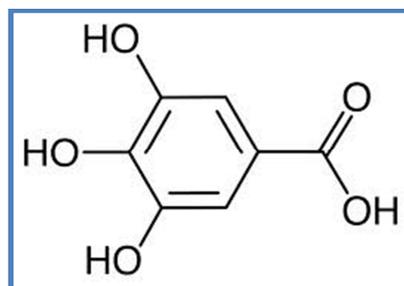


Figure 08 : Structure de l'acide gallique (Al-Zahrani, 2012).

IV. 2. Biosynthèse

Les principales étapes de la biosynthèse de l'acide gallique ont été précisées suite à un ensemble d'expériences on utilisant des précurseurs marqués au C¹⁴. Ces études ont montré que la voie de sa formation est liée au métabolisme des glucides (Figure 09).

En effet les substances initiales utilisées dans cette biosynthèse sont des produits de la glycolyse et du cycle des pentoses phosphates : le phosphoénol pyruvate et l'érythrose-4-phosphate. Leur condensation et cyclisation conduisent à la formation d'un intermédiaire important : l'acide shikimique. Celui-ci se transforme en acide oxybenzoïques ou acide gallique (**Brzowska et Hanower, 1976 ; Ossipov et al., 2003**).

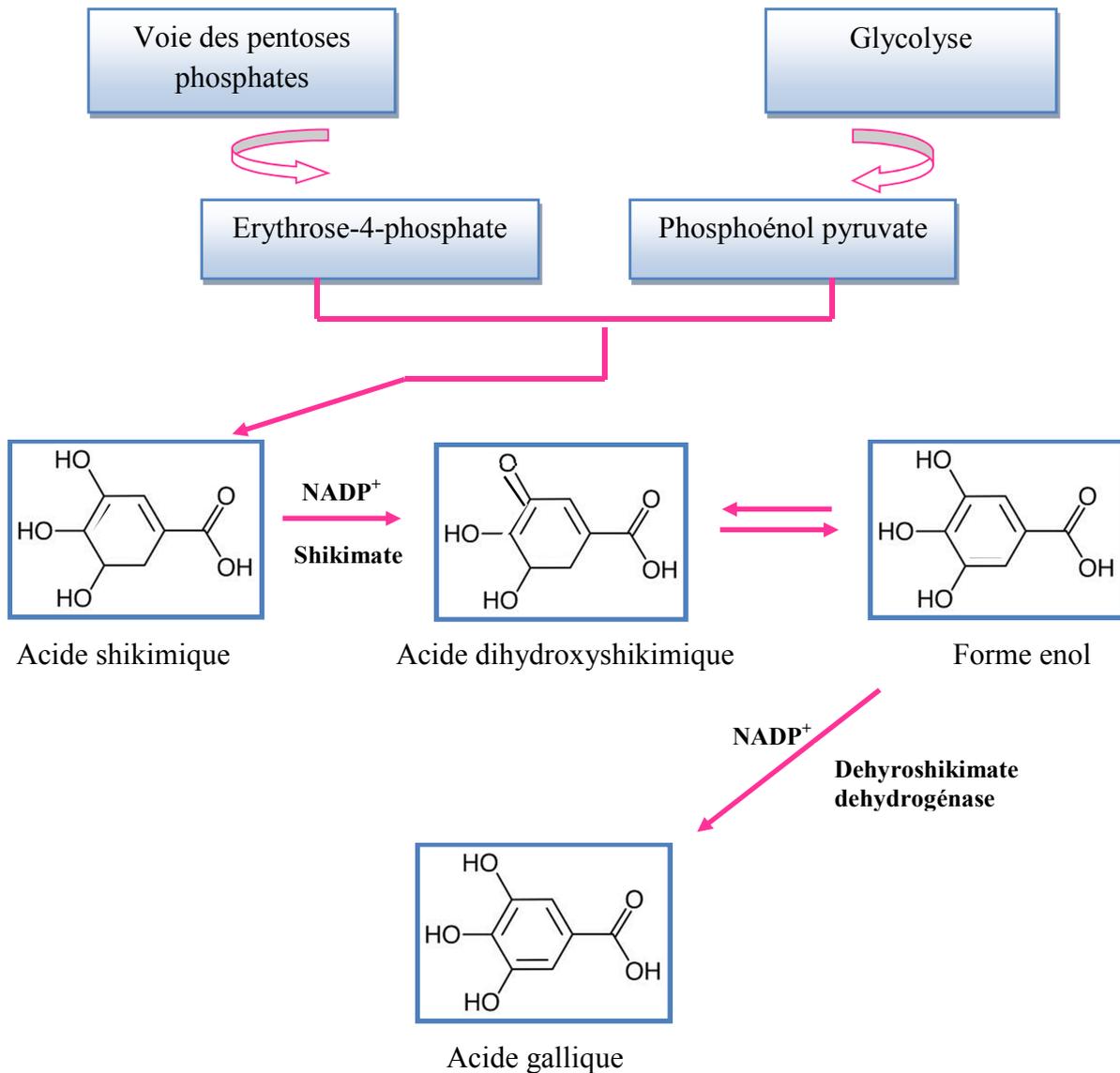


Figure 09 : Biosynthèse de l'acide gallique (**Ossipov et al., 2003**).

IV. 3. Métabolisme

L'acide gallique est un acide phénol abondant dans l'alimentation, il existe sous forme libre ou liée. Les formes libres (aglycones) peuvent être directement absorbées au niveau de l'intestin grêle tandis que les formes liées (glycosylées) doivent être hydrolysées, sous l'influence des glucosidases, par la flore intestinale au niveau du côlon avant d'être absorbées (**Manache *et al.*, 2004**). Il est estimé qu'un apport de 8 mg conduit à une concentration sanguine au pic d'absorption de 2mmol/l toute forme confondue. La forme libre non modifiée représente alors moins de 2 % de l'acide gallique circulant (**Cartron *et al.*, 2003 ; Descheemaeker, 2004**).

L'acide gallique est métabolisé en acide 4-O-méthyl-gallique ensuite est excrété dans les urines sous forme libre ou glucuronidée (**De-Reynal et Multon, 2009**).

4. Propriétés pharmacologiques

Les propriétés pharmacologiques de l'acide gallique sont nombreuses et multiples, les principales sont :

- **Activités antioxydantes**

Les travaux de recherche effectués ces dernières années ont permis de démontrer l'intérêt de l'acide gallique dans la protection contre les espèces réactives de l'oxygène. En effet **Vijaya Padma *et al.* (2011)** ont montré que le traitement des rats par l'acide gallique prévient les dommages oxydatives causés par le Lindane.

Il a été également prouvé que à la concentration de 4,17 mM, il est capable de piéger 44 % des radicaux 2.2-diphenyl-1-picryl hydrosyl (DPPH') et 60 % du peroxyde d'hydrogène (**Gow-Chin *et al.*, 2002**).

- **Activité antitumorale**

Plusieurs études réalisés sur animaux ou sur cultures cellulaires ont montré une activité cytotoxique sélective contre les cellules cancéreuses (leucémie, cancers gastrique, cancer de la prostate, cancer du poumon ...etc) (**Sharad *et al.*, 2013**).

You et al., (2010) ont observé que l'acide gallique provoquait l'apoptose des cellules tumorales. Les observations enregistrées au cours de leurs travaux suggèrent que la mort cellulaire induite par l'acide gallique est liée au stress oxydant résultant de la production d'espèces oxygénées notamment les radicaux superoxyde mitochondriaux ($O_2^{\cdot-}$).

- **Activité antimicrobienne**

De nombreux travaux ont prouvé un effet antibactérien de l'acide gallique. En effet **Borges et al., (2013)** ont signalé que l'acide gallique exerce un effet bactériostatique et/ou bactéricide sur différentes souches bactériennes. Les résultats des différents tests réalisés par **Díaz-Gómez et ses collaborateurs (2013)** sur des souches bactériennes en milieux de culture montraient aussi que l'acide gallique possède un effet bactériostatique dose dépendant et meilleur comparativement à l'effet exercé par la cathéchine.

D'après **Dorman (2000)**, les composants phénoliques sont fortement actifs contre les micro-organismes et agissent comme agents dénaturants les protéines. Ces composés sont capables de se fixer sur certaines protéines et enzymes, modifiant les équilibres enzymatiques (**Ozawa et al., 1987**). De plus, **Kratz et al., (2008)** ont montré que l'acide gallique peut réduire la réplication du virus d'herpès HSV-2, cette activité anti-virale est dose dépendante.

- **Activité neuroprotectrice**

De récentes études laissent également penser que l'acide gallique posséderait un effet neuroprotecteur (**Mansouri et al., 2013 ; Jing et al., 2014**). En effet l'étude de **Farbood et ses collaborateurs (2013)** a permis de mettre en évidence que l'acide gallique peut avoir des effets protecteurs contre l'ischémie cérébrale ainsi que les troubles de la mémoire chez le rat.

ETUDE EXPERIMENTALE

MATERIEL ET METHODES

1. Etude phytochimique

1.1. Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé est constitué du fruit de *Punica granatum*, récoltés vers la fin du mois de septembre et le début du mois d'octobre 2011, dans la région de M'jaz El-safa wilaya de Guelma Nord Est d'Algérie.

Le fruit récolté a été lavé à l'eau de robinet puis conservé à l'abri de la lumière, de l'humidité et à température ambiante jusqu'à l'utilisation.

Le jus du fruit a été préparé quotidiennement à partir des arilles et à l'aide d'un blinder (Moulinex, France).

1.2. Teneur en flavonoïdes, en tanins et en polyphénols du jus *Punica granatum*

1.2.1. Dosage des flavonoïdes totaux

- **Principe**

Le dosage des flavonoïdes totaux est effectué selon la méthode décrite par **Zhishen et al., (1999)**. Elle est basée sur un test colorimétrique utilisant le trichlorure d'aluminium $AlCl_3$. Ce dernier forme des complexes acides stables soit avec le carbonyle (C=O en position C-4) soit avec le groupe hydroxyle (en C-3 ou C-5) des flavones et des flavonols, mais également avec les groupements orthodihydroxyles (éventuellement présents sur le noyau A et/ou B) des flavonoïdes. Ces composés présentent une absorbance maximale à 430 nm.

- **Mode opératoire**

1.5 ml du méthanol sont ajoutés à 0.5 ml de la solution de l'échantillon de concentration 1mg/ml. Ensuite nous avons ajouté 0.1ml de la solution de $AlCl_3$ à 10 %, 0.1 ml d'acétate de sodium 1 M et 2.8 ml d'eau ultra pure (bidistillée). Le mélange est agité vigoureusement puis laissé pendant 30 minutes à l'obscurité avant de lire la densité optique à 430 nm.

- **Calcul de la concentration**

La teneur en flavonoïdes totaux est calculée à partir de l'équation d'une courbe d'étalonnage de quercétine (0.1 mg/ml) réalisée préalablement dans les mêmes conditions (Figure 10).

Les teneurs en flavonoïdes totaux sont exprimées en mg d'équivalent quercétine par gramme de matière végétale sèche (mg EQ/g Ms) ou en mg d'équivalent quercétine par gramme d'extrait (mg EQ/g extrait).

1.2.2. Dosage des tanins condensés

- **Principe**

Le dosage des tanins condensés a été réalisé par la méthode décrite par **Julkunen-Titto, (1985)** utilisant la vaniline. Cette dernière réagit avec les flavan-3-ols libres et l'unité terminale des proanthocyanidines donnant une coloration rouge dont l'intensité est proportionnelle au taux de flavanols présents dans le milieu et qui représente un maximum d'absorption à 500 nm.

- **Mode opératoire**

Nous avons procédé aux étapes suivantes :

- Préparer deux séries de tubes à essai (deux tubes dans chaque série).
- 1ml de la solution d'échantillon de concentration 1mg/ml a été introduit dans un tube de chacune des deux séries.
- Ajouter 5 ml de la solution vanilline à 1 %, HCl à 8 % (réactif de l'analyse) dans chacun des tubes de la première série à 1 minute d'intervalle.
- Ajouter 5 ml de la solution HCl à 4 % dans chacun des tubes de la deuxième série à 1 minute d'intervalle.
- Les tubes sont ensuite introduits au bain marie à 30°C pendant 20 min.
- Lire les absorbances optiques à 500nm en respectant l'intervalle d'une minute.

- **Calcul de la concentration**

La teneur en tanins condensés est calculée à partir de l'équation de la courbe d'étalonnage de catéchine (0.3 mg/ml). Cette courbe a été réalisée dans les mêmes conditions (Figure 11). Les teneurs en tanins sont exprimées en mg de catéchine par gramme d'extrait (mg catéchine/g extrait).

1.2.3. Dosage des polyphénols totaux

- **Principe**

Le dosage des composés phénoliques a été effectué selon la méthode de **Wolfe et al., (2003)**, utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu. L'oxydation des phénols réduit ce réactif en un composé de couleur bleue, l'intensité de la couleur est proportionnelle au taux de composés phénoliques oxydés.

- **Mode opératoire**

1.5 ml de réactif Folin-Ciocalteu dilué (10×) est ajouté à 200 µl de la solution d'échantillon de concentration 1mg/ml. Le mélange est agité vigoureusement puis incubé à l'obscurité pendant 5 min à 25°C. Ensuite, 1.5 ml de carbonate de sodium Na₂CO₃ (60 g/l) est ajouté. Le mélange est incubé à l'obscurité pendant 90 min à 20°C avant de lire la densité optique à 725 nm.

- **Calcul de la concentration**

La teneur en polyphénols totaux est calculée à partir de l'équation de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique (0.2 mg/ml). Cette courbe a été réalisée dans les mêmes conditions de concentration (Figure 12). Les teneurs en polyphénols totaux sont exprimées en mg équivalent d'acide gallique par 100 gramme d'extrait (mg EAG/100 g extrait).

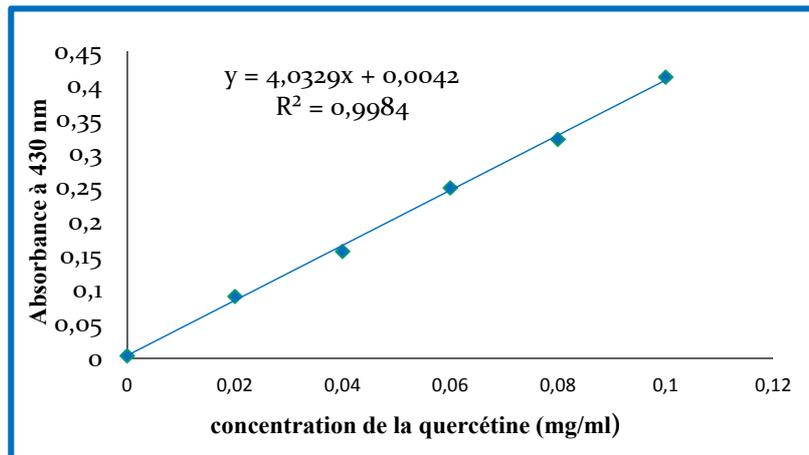


Figure 10 : Courbe d'étalonnage de la quercétine.

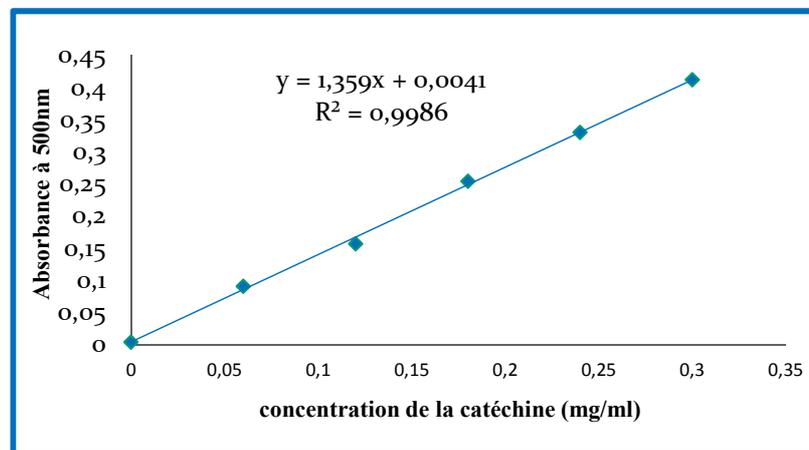


Figure 11 : Courbe d'étalonnage de la catéchine.

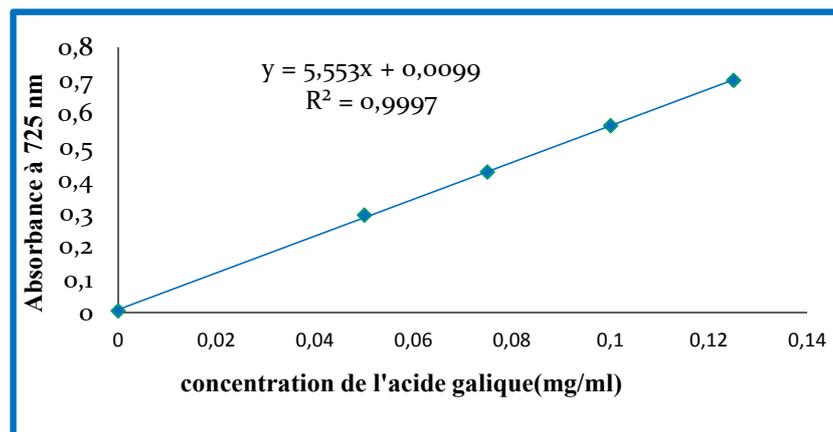


Figure 12 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

1.3. Evaluation du potentiel anti-radicalaire

1.3.1. Test de DPPH

- **Principe**

Le potentiel anti-radicalaire est déterminé selon la méthode de **Blois, (1958)**, utilisant le 2,2-diphényl-1-picryl hydrosyl (DPPH). Ce dernier agit en tant qu'un radical libre stable à une température ambiante. Le principe de cette méthode est basé sur la réduction du DPPH par un antioxydant présent dans le composé à tester (généralement les composés phénoliques) formant un nouveau composé de coloration jaune. Ce dernier montrait un spectre d'absorption à 517 nm.

- **Mode opératoire**

A partir de l'échantillon à analyser on prépare la solution mère (1 mg/ml) à partir de laquelle on prépare plusieurs solutions à différentes concentration par dilution (on obtient une gamme des concentrations). Les différentes étapes du mode opératoire sont représentés par le tableau suivant :

Réactif	Blanc	Totale 100%	Essai
Échantillon (ml)	-	-	2
DPPH (0.3 mM) (ml)	-	2	2
Ethanol (ml)	2	2	-

Après agitation par un vortex, les tubes sont placés à l'obscurité à température ambiante pendant 30 minutes. L'absorbance est mesurée à 517 nm.

- **Calcul du potentiel anti-radicalaire**

Le potentiel anti-radicalaire est déterminé en termes d'IC₅₀, concentration du jus de *Punica granatum* qui exerce 50 % d'inhibition des radicaux libres DPPH. Pour calculer l'IC₅₀ de l'échantillon, il faut tracer une courbe qui représente le pourcentage d'inhibition (PI) en fonction de la concentration. Les résultats peuvent être exprimés en tant que pourcentages d'activité anti-radicalair, en utilisant la formule suivante :

$$PI = \left(1 - \frac{DO \text{ essai}}{DO \text{ T } 100\%}\right) \times 100 \quad \text{ou} \quad \frac{DO \text{ T } 100\% - DO \text{ essai}}{DO \text{ T } 100\%} \times 100$$

1.3.2. Test de NBT/Riboflavine

- **Principe**

Dans ce teste, on a utilisé la méthode décrite par **Yen et Chen, (1995)**. La génération du l'anion superoxyde se fait par l'oxydation de la riboflavine couplée à la réduction de nitrobluetetrazolium (NBT). Le composé libéré (formazan) présente un spectre d'absorbance à 560 nm. L'effet antioxydant est traduit en pourcentage d'inhibition de la formation de formazan par rapport au contrôle négatif (ne contient pas l'extrait à testé).

- **Mode opératoire**

A partir de l'échantillon à analyser on prépare la solution mère (1mg/ml) à partir de laquelle on prépare plusieurs solutions à différentes concentrations par dilution (on obtient une gamme des concentrations). Les différentes étapes du mode opératoire sont représentées dans le tableau suivant :

Réactif	Blanc	Totale 100%	Essai
Tampon phosphate (67mM) (µl)	800	800	800
H ₂ O distillée (µl)	600	500	400
EDTA ₄ Na (µl)	100	100	100
Échantillon (µl)	-	-	100
NBT (1.5mM) (µl)	-	100	100
Riboflavine (0.12mM) (µl)	50	50	50

On agite et on incube pendant 5min sous une lampe de bureau l'absorbance est mesurée à 560 nm.

- **Calcul du potentiel scavenger de l'anion superoxyde**

Il est déterminé en termes d'IC₅₀, concentration du jus de *Punica granatum* qui exerce 50 % d'inhibition. Pour calculer l'IC₅₀ de l'échantillon, il faut tracer une courbe : pourcentage d'inhibition (PI) en fonction de la concentration. Les résultats peuvent être exprimés en tant que pourcentages d'activité scavenger de l'anion superoxyde, en utilisant la formule suivante :

$$PI = \left(1 - \frac{DO \text{ esai}}{DO \text{ T } 100\%}\right) \times 100 \quad \text{ou} \quad \frac{Do \text{ T } 100\% - DO \text{ esai}}{DO \text{ T } 100\%} \times 100$$

2. Etude biologique

2.1. Animaux et régime

Nous avons travaillé sur 36 rats mâles de la souche wistar provenant de l'institut Pasteur d'Alger d'un poids moyen de 239 ± 3 g.

Ces rats sont mis dans des cages en polyéthylène munies d'un mangeoire et d'un biberon d'eau et tapissées d'une litière composée de copeaux de bois changée tous les jours.

L'acclimatation des rats a été effectuée au niveau de l'animalerie de la faculté des sciences (université d'Annaba), dans les conditions ambiantes de température ($23 \pm 2^\circ\text{C}$), d'hygrométrie (40 %) et de photopériode naturel.

La nourriture composée de maïs, de soja, de minéraux et de compléments vitaminés (Tableau 01) ainsi que l'eau de boisson, sont apportés aux rats *ad libitum*.

Tableau 01: Composition de l'alimentation pour 1 kilogramme d'aliment.

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

2.2. Traitement des rats

Les rats ont été répartis en deux groupes expérimentaux de 18 rats chacun :

- Croupe A : rats non traités reçoivent 1 ml d'eau distillée par voie orale.
- Croupe B : rats traités quotidiennement par 1ml du jus de *Punica granatum* a été administrée aux rats par gavage à l'aide d'une seringue une fois par jours à un temps fixe (10:00 du matin) pendant cinq semaines (**Collins et al., 2001**).

Après cinq semaines de prétraitement le groupe A est subdivisé en trois sous groupes de six rats chacun, il s'agit de :

- Sous groupe (A₁ : Témoins) : témoins sains qui reçoivent 1ml d'eau distillée par voie orale.
- Sous groupe (A₂ : NaF) : rats traités par le fluorure de sodium dissout dans l'eau de boisson à une concentration de 100 ppm (**Turk et al., 2008**).
- Sous groupe (A₃ : NaF+AG) : les rats de ce groupe ont été traité comme ceux du sous groupe (NaF) plus un traitement quotidien par l'acide gallique administré par voie orale à raison 20 mg/kg de poids corporels une fois par jour à un temps fixe (11:00 du matin) (**Prasad et al., 2006**).

Le groupe B est subdivisé également en trois sous groupes de six rats chacun, il s'agit de :

- Sous groupe (B₁ : NaF+ PG) : rats traités comme ceux du sous groupe (NaF) plus une administration quotidienne de 1ml du jus de *Punica granatum* par voie orale à un temps fixe (10:00 du matin).
- Sous groupe (B₂ : NaF+AG+PG) : rats de traités comme ceux du sous groupe (NaF+AG) plus une administration quotidienne de 1ml du jus de *Punica granatum* par voie orale à un temps fixe (10:00 du matin).
- Sous groupe (B₃ : PG) : rats traités par 1ml du jus de *Punica granatum* par voie orale à un temps fixe (10:00 du matin).

Le traitement par le fluorure de sodium (NaF) ainsi que par les combinaisons NaF+AG, NaF+PG et NaF+AG+PG est poursuivi pendant 21 jours.

Les animaux ont été pesés régulièrement pendant toute la période du traitement afin de suivre l'évolution du poids corporel. De plus, la consommation quotidienne en aliment et en eau de boisson ainsi que la quantité de fluorure de sodium ingérée ont été également mesurée au cours de l'expérimentation.

3. Sacrifices des rats et prélèvement des échantillons

A la fin de l'expérimentation les différents groupes de rats sont sacrifiés par décapitation.

3.1. Prélèvement sanguin

Les prélèvements sanguins ont été réalisés soit :

- Sur des tubes à EDTA, pour déterminer la formule de numération sanguine(FNS).
- Sur des tubes héparinés, centrifugés ensuite (10 min à 3000 tours/min) afin de séparer le culot du plasma, qui a été conservé à -18°C pour le dosage ultérieur des paramètres biochimiques à l'exception du fer sérique, tandis que le culot a été utilisé pour récupérer les érythrocytes. Le lavage des érythrocytes a été réalisé selon la méthode décrite par **Dodge et al., (1963)**. Les érythrocytes précipités sont lavés trois fois avec un tampon phosphate (0.1 M, pH 7.4) et centrifuger à 3000 tours/min pendant 15 min. Le culot cellulaire obtenu sur héparine servira pour mesurer les paramètres du stress oxydatif.
- Sur des tubes sec centrifugés ensuite pendant 10 minutes à 3000 tours/min afin de récupérer le sérum, qui a été conservé à -18°C pour doser les hormones ainsi que le fer sérique.

3.2. Prélèvement des organes

Après dissection des animaux, le foie, les reins, le cœur et les testicules sont rapidement prélevés, débarrassés de leurs tissus adipeux, rincés dans une solution de chlorure de sodium (NaCl à 0,9 %) puis pesés. Ensuite la moitié de chacun de ces organes a été conservés dans le formol afin de réaliser l'étude histologique. L'autre moitié à été conservée à -18°C pour le dosage des paramètres du stress oxydatif. La figure 13 schématise les différentes étapes du protocole expérimental.

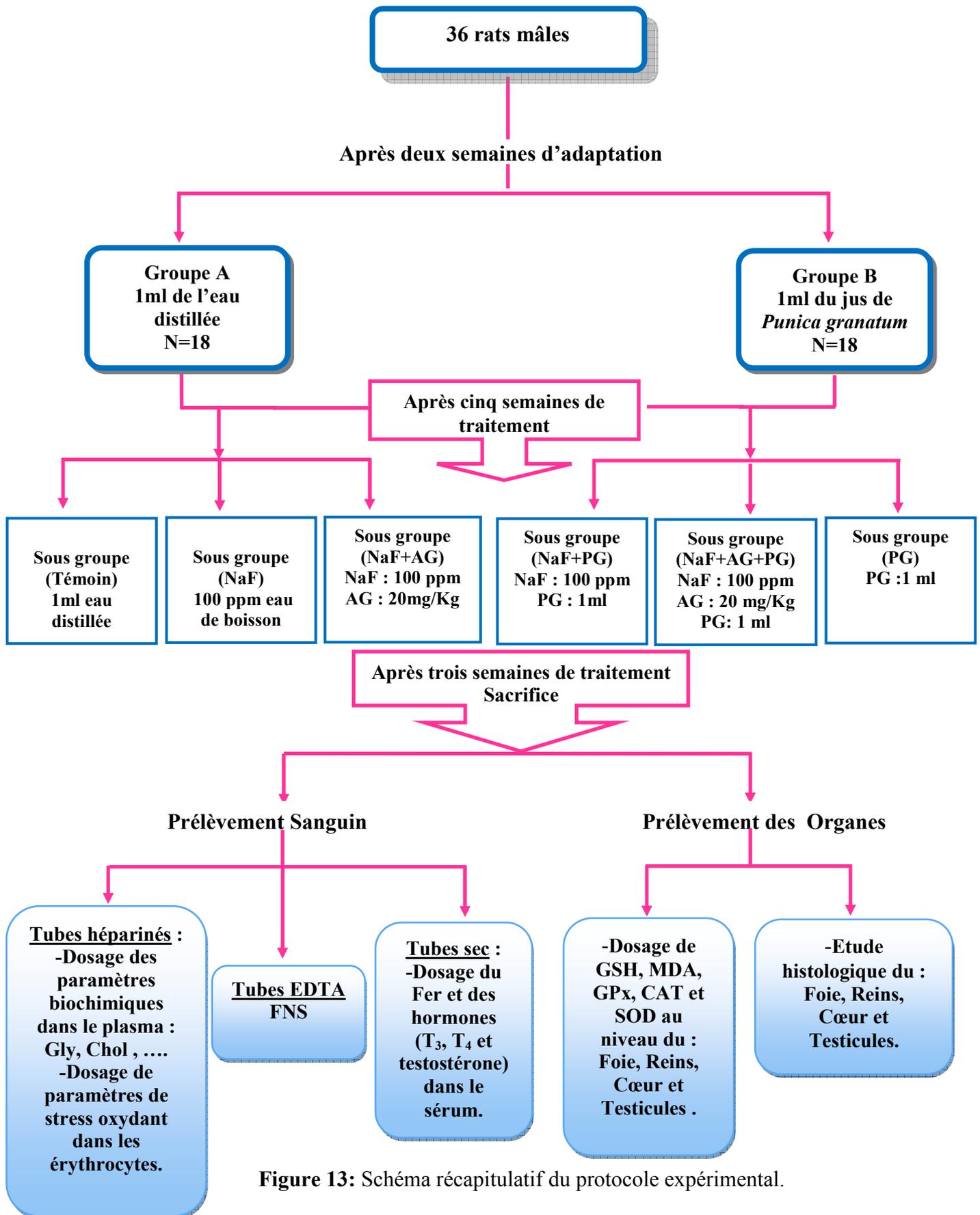


Figure 13: Schéma récapitulatif du protocole expérimental.

4. Détermination de la formule de numération sanguine (FNS)

La détermination de la formule de numération sanguine a été effectuée à l'aide d'un automate de type " Selectra E ".

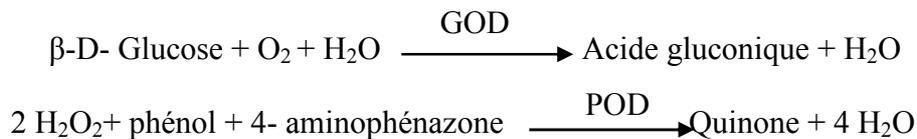
5. Techniques de dosage

5.1. Exploration de la fonction hépatique

5.1.1. Dosage du glucose

- **Principe**

Sous l'action du glucose oxydase, le glucose est oxydé en acide gluconique avec libération du peroxyde d'hydrogène H₂O₂ qui réagit sous l'action d'une peroxydase avec le phénol et le 4-aminophénazone pour former le quinone qui est un complexe coloré en rose. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration du glucose dans l'échantillon (**Kaplan, 1984 a; Trinder, 1969**).



- **Réactifs utilisés**

Réactifs	Composition	Concentration
Réactif	Tris pH 7.4	92 mmol/l
	Phénol	0.3 mmol/l
	Glucose oxydase (GOD)	15000 U/l
	Peroxydase (POD)	1000 U/l
	4-aminophénazone (4-AP)	2.6 mmol/l
Étalon	Glucose	100 mg/dl

- **Échantillon** : plasma

- **Mode opératoire**

Réactifs	Blanc	Étalon	Échantillon
Réactif (ml)	1.0	1.0	1.0
Étalon (µl)	-	10	-
Échantillon (µl)	-	-	10
H ₂ O distillée (µl)	10	-	-

Mélanger et incuber pendant 10 minutes à 37°C. La lecture de l'absorbance optique (A) à 505 nm s'effectue contre le blanc réactif. La coloration est stable pendant 30 minutes.

- **Calcul de la concentration**

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

5.1.2. Dosage des protéines totales

- **Principe**

Les ions cuivriques, dans un milieu alcalin, interagissent avec les liaisons peptidiques des protéines formant un complexe coloré en bleu-violet. L'intensité de la couleur est proportionnelle à la concentration des protéines totales dans les échantillons (**Koller, 1984; Burtis et al., 1999**).

- **Réactifs utilisés**

Réactifs	Composition	Concentration
R Biuret	Tartrate de sodium potassium	15 mmol/l
	Sodium iodique	100 mmol/l
	Potassium iodique	5 mmol/l
	Cuivre de sulfate	19 mmol/l
Étalon	Sérum albumine bovine	70 g/l

- **Échantillon** : plasma.

- **Mode opératoire**

Réactifs	Blanc	Étalon	Échantillon
Réactif (ml)	1.0	1.0	1.0
Étalon (µl)	-	25	-
Échantillon (µl)	-	-	25
H ₂ O (µl)	25	-	-

Mélanger et incuber pendant 5 minutes à 37°C. L'absorbance optique (A) est lue à 540 nm contre le blanc réactif. La coloration est stable pendant 30 minutes.

- **Calcul de la concentration**

$$\text{Protéines totales (g/dl)} = \frac{(A)\text{échantillon}}{(A)\text{étalon}} \times 7\text{g/dl (concentrations de l'étalon)}$$

5.1.3. Dosage d'albumine

- **Principe**

L'albumine réagit avec le vert de bromocrésol (BCG), pour former un complexe coloré. Le pH du milieu est maintenu à 4.2 par le tampon. Après l'incubation, l'absorbance du mélange est mesurée à 628 nm (Roskey, 1965; Doumas, 1971; Webster, 1974).

- **Réactifs utilisés**

Réactifs	Composition	Concentration
R ₁	Vert de bromocrésol pH 4.2	0.12 mmol/l.
Étalon	Albumine	5 g/dl

- **Échantillon** : plasma
- **Mode opératoire**

Réactifs	Blanc	Étalon	Échantillon
Réactif (ml)	1.0	1.0	1.0
Étalon (µl)	-	5	-
Échantillon (µl)	-	-	5
H ₂ O distillée (µl)	5	-	-

Après une incubation à température ambiante pendant 10 minutes, l'absorbance optique est lue à 630 nm contre le blanc réactif. La coloration est stable pendant une heure à température ambiante.

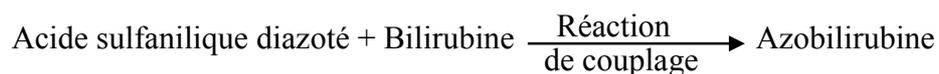
- **Calcul de la concentration**

$$\text{Albumine (g/dl)} = \frac{(A)\text{échantillon}}{(A)\text{étalon}} \times 5 \text{ g/dl (concentration de l'étalon)}$$

5.1.4. Dosage de la bilirubine totale

- **Principe**

La bilirubine est définie comme la quantité de pigment biliaire dans le plasma réagissant avec l'acide sulfanilique diazoté à pH acide pour produire l'azobilirubine selon le schéma réactionnel suivant :



Cette réaction est instantanée avec la bilirubine directe (la bilirubine conjuguée), par contre avec la bilirubine totale (bilirubine non conjuguée) elle est indirecte et qui nécessite la solubilisation par le diméthylsulfoxyde (DMSO), en absence de DMSO, seule la bilirubine directe réagit (**Malloy et al., 1937; Kaplan et al., 1984_b**).

- Réactifs utilisés

Réactifs	Composition	Concentration
R ₁ (D)	Acide sulfanilique	30 mmol/l
	Acide hydrochloridrique	150 mmol/l
R ₂ (T)	Acide sulfanilique	30 mmol/l
	Acide hydrochloridrique	50 mmol/l
	Diméthylsulfoxyde (DMSO)	7 mol/l
R ₃	Nitrite de sodium	29 mol/l

- Échantillon : plasma.

- Mode opératoire

Réactifs	Blanc	B. totale	Blanc	B. directe
R ₁ (D) (ml)	-	-	1.5	1.5
R ₂ (T) (ml)	1.5	1.5	-	-
R ₃ (µl)	-	50	-	50
Échantillon (µl)	100	100	100	100
H ₂ O distillée (µl)	50	-	50	-

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

- Calcul de la concentration

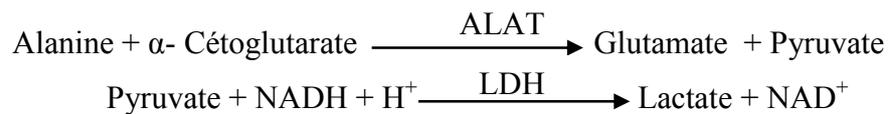
$$\text{Bilirubine plasmatique (mg/dl)} = [(A) \text{ échantillon} - (A) \text{ blanc}] \times \text{facteur B}$$

Facteur B totale = 19.1.

5.1.5. Détermination de l'activité d'alanine aminotransferase (ALAT, EC 2.6.1.2)

- **Principe**

L'alanine aminotransferase (ALAT) appelée aussi glutamate pyruvate transaminase (TGP) catalyse le transfert réversible d'un groupe amine à partir de l'alanine au α -cétoglutarate formant le glutamate et le pyruvate. Le pyruvate produit est réduit en lactate par la lactate déshydrogénase (LDH) et le NADH selon le schéma réactionnel suivant :



Le taux de diminution de la concentration en NADH est directement proportionnel à l'activité de l'alanine aminotransférase présente dans l'échantillon (Murray, 1984_a).

- **Réactifs utilisés**

Réactifs	Composition	Concentration
R₁ Tampon	Tris pH 7.8 L-alanine	100 mmol/l 500 mmol/l
R₂ Substrat	NADH Lactate déshydrogénase (LDH) α -Cétoglutarate	0.18 mmol/l 1200 U/l 15 mmol/l

Pour préparer le réactif de travail nous avons dissout un comprimé du réactif R₂ dans une fiole du réactif R₁. Ce réactif est stable 21 jours à 2-8°C.

- **Échantillon** : plasma
- **Mode opératoire**

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

On mélange et on incube pendant 1 minute et on fait une première lecture de l'absorbance optique (A) à 340 nm. L'absorbance optique (A) est relue à nouveau 3 fois après 1, 2, 3, minutes.

- **Calcul de l'activité**

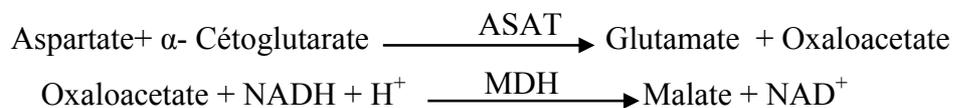
$$\text{Activité ALAT (U/l)} = \Delta A / \text{min} \times 1750$$

$\Delta A / \text{min}$: la valeur moyenne des trois lectures par minute.

5.1.6. Détermination de l'activité d'aspartate aminotransférase (ASAT, EC 2.6.1.1)

- **Principe**

L'aspartate aminotransférase (ASAT) appelée aussi l'oxaloacétate de glutamate transférase (TGO) catalyse le transfert réversible d'un groupe amine à partir de l'aspartate au α -céto glutarate formant le glutamate et l'oxaloacétate. L'oxaloacétate produit est réduit en malate par la malate déshydrogénase (MDH) et le NADH (Murray, 1984_b).



- **Réactifs utilisés**

Réactif	Composition	Concentration
R₁ Tampon	Tris pH 7.8	80 mmol/l
	L-aspartate	200 mmol/l
R₂ Substrat	NADH	0.18 mmol/l
	Lactate déshydrogénase (LDH)	800 U/l
	Malate déshydrogénase (MDA)	600 U/l
	α - Céto glutarate	12 mmol/l

Pour préparer le réactif de travail nous avons dissout un comprimé du réactif R₂ dans une fiole du réactif R₁. Ce réactif est stable pendant 21 jours à 2-8 °C.

- **Échantillon** : plasma
- **Mode opératoire**

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

On mélange et on incube pendant 1 minute et on fait une première lecture de l'absorbance optique (A) à 340 nm. L'absorbance optique (A) est relue 3 fois après 1, 2, 3, minutes.

- **Calcul de l'activité**

$$\text{Activité ASAT (U/l)} = \Delta A / \text{min} \times 1750$$

5.1.7. Détermination de l'activité de la phosphatase alcaline (PAL, EC 3.1.3.1)

- **Principe**

La phosphatase alcaline catalyse l'hydrolyse du p-nitrophénylphosphate à pH 10.4 en phosphate et p-nitrophénol (Composé jaune) (Wenger *et al.*, 1984; Rosalki *et al.*, 1993).



- **Réactifs utilisés**

Réactifs	Composition	Concentration
R₁ Tampon	Diéthanolamine (DEA) pH 10.4	1 mmol/l
	Chlorure de magnésium	0.5 mmol/l
R₂ Substrat	p-nitrophénylphosphate (pNPP)	10 mmol/l

Pour préparer le réactif de travail nous avons dissout un comprimé du réactif R₂ dans une fiole du réactif R₁. Ce réactif est stable 21 jours à 2-8°C.

- **Échantillon** : plasma

- **Mode opératoire**

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

On mélange et on incube pendant une minute ensuite on mesure la variation d'absorbance par minute ($\Delta A/\text{min}$) à 405nm, pendant 3 minutes.

- **Calcul de l'activité**

$$\text{Activité phosphatases alcalines (U/l)} = \Delta A / \text{min} \times 3300$$

5.1.8. Détermination de l'activité de la lactate déshydrogénase (LDH, EC 1.1.1.27)

- **Principe**

La lactate déshydrogénase catalyse la réduction du pyruvate par le NADH selon la réaction suivante:



Le taux de diminution de la concentration en NADH est directement proportionnel à l'activité de LDH présente dans l'échantillon (Pesce, 1984).

- **Réactifs utilisés**

Réactifs	Composition	Concentration
R₁ Tampon	Imidazol	65 mmol/l
	Pyruvate	0.6 mmol/l
R₂ Substrat	NADH	0.18 mmol/l

Pour préparer le réactif de travail nous avons dissout un comprimé du réactif R₂ dans une fiole du réactif R₁. Ce réactif est stable 2 jours à 2-8°C.

- **Échantillon** : plasma

- **Mode opératoire**

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

On agite et on incube une minute à 37°C et on fait une première lecture de l'absorbance optique (A) à 340 nm. L'absorbance optique (A) est relue à nouveau 3 fois après 1, 2, 3, minutes.

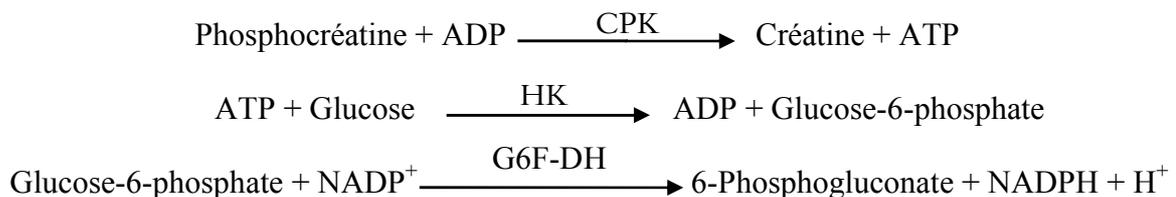
- **Calcul de l'activité**

$$\text{Activité LDH (U/L)} = \Delta A / \text{min} \times 9690$$

5.1.9. Détermination de l'activité de la créatine phosphokinase (CPK, EC 2.7.3.2)

- **Principe**

La créatine phosphokinase (CPK) catalyse le transfert réversible d'un groupe phosphate de la phosphocréatine vers l'ADP. Cette réaction s'ajoute à d'autres catalysées par l'hexokinase (HK) et par le glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6P-DH) :



La vitesse de formation de NADPH, déterminé par photométrie, est proportionnelle à la concentration catalytique de CPK dans l'échantillon testé (Abbot *et al.*, 1984; Gerhardt *et al.*, 1995).

- Réactifs utilisés

Réactifs	Composition	Concentration
R₁ Tampon	Imidazole pH 7.0 Glucose Acétate de magnésium EDTA	100 mmol/l 20 mmol/l 10 mmol/l 2 mmol/l
R₂ Substrat	ADP AMP di-Adénosine-5-pentaphosphate NADP+ Hexokinase (HK) Glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6F-DH) N-acetilcisteine Phosphate de créatine	2 mmol/l 5 mmol/l 10 mmol/l 2 mmol/l 2500 U/l 1500 U/l 20 mmol/l 30 mmol/l

Pour préparer le réactif de travail nous avons dissout une tablette de R₂ dans une capsule R₁ et mélangé le contenu doucement. Ce réactif est stable 10 jours à 2-8 °C.

- Échantillon : plasma.
- Mode opératoire

Température	37°C
Réactif de travail (ml)	1.0
Échantillon (µl)	20

On agite et on incube pendant deux minutes à 37°C et on fait une première lecture de l'absorbance optique (A) à 340 nm. Relie à nouveau chaque minute pendant 3 minutes.

- Calcul de l'activité

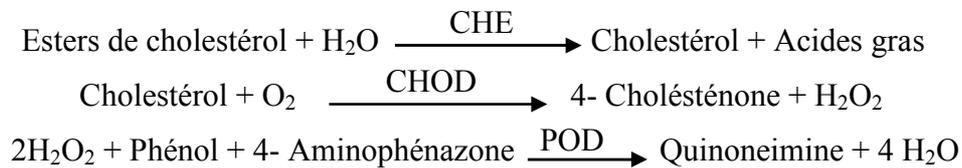
$$\text{Activité CPK (U/l)} = \Delta A / \text{min} \times 8095$$

5.2. Exploration du profil lipidique

5.2.1. Dosage du cholestérol

- **Principe**

Le cholestérol et ses esters sont libérés à partir des lipoprotéines par des détergents. La cholestérol estérase hydrolyse les esters du cholestérol. Le cholestérol libéré est oxydé par le cholestérol oxydase en cholestérol-4-ène-3-one avec formation du H₂O₂. Ce dernier réagit avec le phénol et le 4-Aminophénazone pour donner sous l'action d'une peroxydase, du quinonéimine rosâtre. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration du cholestérol dans l'échantillon (Meiattini *et al.*, 1978).



- **Réactifs utilisés**

Réactifs	Composition	Concentration
R₁ Tampon	PIPES pH 6.9 Phénol	90 mmol/l 26 mmol /l
R₂ Enzymes	Cholestérol estérase (CHE) Cholestérol oxydase (CHOD) Peroxydase (POD) 4- Aminophénazone (4- AP)	300 U/l 300 U/l 1250 U/l 0.4 mmol/l
Étalon	Cholestérol	200 mg/dl

Le réactif de travail est préparé en mélangeant le contenu de la fiole du réactif (R₂) dans un flacon du réactif (R₁). Le réactif de travail est stable 4 mois à 2-8°C.

- **Échantillon** : plasma

- **Mode opératoire**

Réactifs	Blanc	Étalon	Échantillon
Réactif de travail (ml)	1.0	1.0	1.0
Étalon (µl)	-	10	-
Échantillon (µl)	-	-	10
H ₂ O distillée (µl)	10	-	-

Nous mélangeons et nous laissons incuber pendant 5 minutes à 37°C. L'absorbance optique (A) est lue à 505 nm contre le blanc réactif. La coloration est stable pendant 60 minutes.

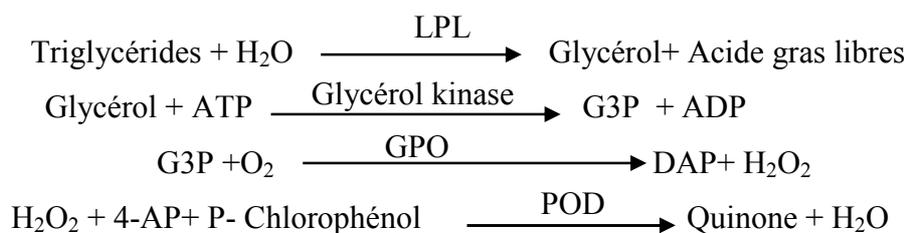
- **Calcul de la concentration**

$$\text{Cholestérol (mg/dl)} = \frac{(A)\text{échantillon}}{(A)\text{étalon}} \times 200 \text{ mg/dl (concentrations de l'étalon)}$$

5.2.2. Dosage des triglycérides

- **Principe**

Les triglycérides sous l'action de la lipoprotéine lipase sont libérés et hydrolysés en glycérol et acides gras libres. Le glycérol, sous l'effet du glycérol kinase et l'ATP, forme l'adenosine-5-diphosphate (ADP) et le glycérol-3-phosphate(G3P) qui est converti en dihydroxyacétone phosphate (DAP) et H₂O₂ sous l'action du glycérol phosphate déshydrogénase (GPO). Le H₂O₂ libéré réagit avec 4-aminophenazone (4-AP) et le p-chlorophénol pour donner, sous l'action d'une peroxydase (POD), de la quinone qui est un complexe coloré en rose. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration des triglycérides dans l'échantillon (Buccolo *et al.*, 1973; Fossati *et al.*, 1982; Kaplan *et al.*, 1984).



- **Réactifs utilisés**

Réactifs	Composition	Concentration
R₁ Tampon	GOOD pH 7.5 p-chlorophénol	50 mmol/l 2 mmol/l
R₂ Enzymes	Lipoprotéine Lipase (LPL) Glycérol kinase (GK) Glycérol-3- P- Oxydase (GPO) Peroxydase (POD) 4-Aminophénazone (4-AP) ATP	150000 U/l 500 U/l 2500 U/l 440 U/l 0.1 mmol/l 0.1 mmol/l
Étalon	Triglycérides	200 mg/dl

Le réactif de travail est préparé en mélangeant le contenu de la fiole du réactif (R₂) dans un flacon du réactif (R₁). Le réactif de travail est stable 6 semaines à 2-8°C.

- **Échantillon** : plasma
- **Mode opératoire**

Réactifs	Blanc	Étalon	Échantillon
Réactif de travail (ml)	1.0	1.0	1.0
Étalon (µl)	-	10	-
Échantillon (µl)	-	-	10
H₂O distillée (µl)	10	-	-

Après agitation et incubation pendant 5 minutes à 37°C. L'absorbance optique (A) est lue à 505 nm contre le blanc réactif. La coloration est stable pendant 30 minutes.

- **Calcul de la concentration**

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

5.2.3. Dosage du HDL-cholestérol

- **Principe**

Les VLDL et les LDL sont précipités par le phosphotungstate en présence du magnésium. Après centrifugation le surnageant contenant les HDL est utilisé pour la détermination du HDL-cholestérol (Grove, 1979).

- **Réactifs utilisés**

Réactif	Composition	Concentration
Réactif de précipitation	Acide phosphotungstique	14 mmol/l
	Chloride de magnésium	2 mmol /l

- **Échantillon** : plasma

- **Mode opératoire**

Réactif (µl)	100
Échantillon (ml)	1.0

Nous mélangeons et nous laissons incuber pendant 10 minutes à température ambiante. Ensuite on centrifuge les échantillons à 4000 tour/min pendant 20 minutes. Pour déterminer la concentration de HDL-cholestérol on a suivi les même étapes du dosage du cholestérol.

- **Calcul de la concentration**

La concentration du HDL-cholestérol est calculée par la formule suivante :

$$\text{HDL-cholestérol (mg/dl)} = \frac{(A)\text{échantillon}}{(A)\text{étalon}} \times \text{concentrations de l'étalon mg/dl}$$

5.3. Exploration de la fonction rénale

5.3.1. Dosage de l'urée

- **Principe**

Sous l'action de l'uréase, l'urée est hydrolysé en ammoniacque (NH₄) et dioxyde de carbone (CO₂). Les ions d'ammoniaques formés réagissent avec le salicylate et d'hypochlorite de sodium (NaClO) en présence de nitroprusside pour donner un complexe coloré en vert, l'intensité de couleur est proportionnelle à la concentration de l'urée dans le plasma (Fawcett *et al.*, 1960 ; Tabacco *et al.*, 1979; Kaplan *et al.*, 1984_d).



- **Réactifs utilisés**

Réactifs	Composition	Concentration
R₁ Tampon	Phosphate pH 6.7 EDTA Salicylate de sodium Nitroprusside de sodium	50 mmol/l 2 mmol/l 400 mmol/l 10 mmol/l
R₂ NaClO	Hypochlorite de sodium (NaClO) Hydroxide de sodium	140 mmol/l 150 mmol/l
R₃ Enzymes	Urease	30000 U/l
Étalon	Solution standard d'urée	50 mg/dl

Pour préparer le réactif de travail nous avons dissout un comprimé du réactif R₃ dans un flacon du réactif R₁. Ce réactif est stable un mois à 2-8°C.

- **Échantillon** : plasma.
- **Mode opératoire**

Réactifs	Blanc	Étalon	Échantillon
Réactif de travail (ml)	1.0	1.0	1.0
Étalon (µl)	-	10	-
Échantillon (µl)	-	-	10
H₂O distillée (µl)	10	-	-

Après agitation et incubation à 37° pendant 5 minutes, on pipette :

Réactifs	Blanc	Étalon	Échantillon
R ₂ (ml)	1.0	1.0	1.0

Après une deuxième incubation à 37°C pendant 5 minutes, l'absorbance optique (A) est lue à 580 nm contre le blanc réactif. La coloration est stable pendant 30 minutes.

- **Calcul de la concentration**

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

5.3.2 Dosage de la créatinine

- **Principe**

L'essai est basé sur la réaction de la créatinine avec le picrate de sodium c'est la réaction de Jaffé. 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 dans l'échantillon (Murray, 1984).

- **Réactifs utilisés**

Réactifs	Composition	Concentration
R ₁	Acide picrique	17.5 mmol/l
R ₂	Hydroxyde de sodium	0.29 mmol/l
Étalon	Créatinine	2 mg/dl

Pour préparer le réactif de travail nous avons mélangé des volumes égaux du réactif R₁ et du réactif R₂. Le réactif de travail est stable 10 jours à 15-20°C

- **Échantillon** : plasma
- **Mode opératoire**

Réactifs	Blanc	Étalon	Échantillon
Réactifs (ml)	1.0	1.0	1.0
Étalon (µl)	-	100	-
Échantillon (µl)	-	-	100
H ₂ O distillée (µl)	100	-	-

Mélanger, déclencher le chronomètre. Lire à 492 nm l'absorbance optique (A₁) après 30 secondes et l'absorbance optique (A₂) après 90 secondes.

- **Calcul de la concentration**

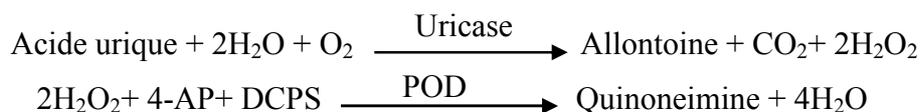
$$\text{Créatinine (mg/dl)} = \frac{(\Delta A)_{\text{échantillon}} - (\Delta A)_{\text{Blanc}}}{(\Delta A)_{\text{étalon}} - (\Delta A)_{\text{Blanc}}} \times 2 \text{ mg/dl (concentration de l'étalon)}$$

$$\Delta A = (A_2 - A_1).$$

5.3.3. Dosage de l'acide urique

- **Principe**

L'acide urique est oxydé par l'uricase en allantoïne et H₂O₂, ce dernier et en présence de la peroxydase (POD), 4- Aminophénazone (4- AP) et le 2-4 Dichlorophénol sulfonate (DCPS) forme un complexe coloré le quinoneimine où l'intensité de la couleur formée est proportionnelle à la concentration de l'acide urique plasmatique (**Fossati et al., 1980**).



- Réactifs utilisés

Réactifs	Composition	Concentration
R₁ Tampon	Phosphate pH 7.4	50 mmol/ L
	2-4 Dichlorophénol sulfonate (DCPS)	4 mmol/ L
R₂ Enzymes	Uricase	60 U/L
	Peroxydase (POD)	660 U/L
	Ascorbate oxydase	200 U/L
	4- Aminophénazone (4- AP)	1 mmol/ L
Étalon	Acide urique	6 mg/dl

Le réactif de travail est préparé en mélangeant le contenu du réactif (R₂) dans la fiole du réactif (R₁). Le réactif de travail est stable un mois à 2-8°C.

- **Échantillon** : plasma.
- **Mode opératoire**

Réactifs	Blanc	Étalon	Échantillon
Réactif de travail (ml)	1.0	1.0	1.0
Étalon (µl)	-	25	-
Échantillon (µl)	-	-	25
H₂O distillée (µl)	25	-	-

On agite et en incube pendant 5 minutes à 37°C. L'absorbance optique (A) est lue à 520 nm contre le blanc réactif. La coloration est stable pendant 30 minutes.

- **Calcul de la concentration**

$$\text{Acide urique (mg/dl)} = \frac{(A)\text{échantillon}}{(A)\text{étalon}} \times 6 \text{ mg/dl (concentration de l'étalon)}$$

5.4. Dosage des hormones thyroïdiennes

Le dosage de la T₃, la T₄ a été effectué à l'aide d'un automate de type "Ellexys 2010".

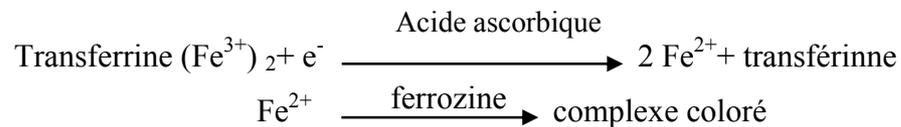
5.5. Dosage de la testostérone

Le dosage de la testostérone a été effectué à l'aide d'un automate de type "Ellexys 2010".

5.6. Dosage du fer

- **Principe**

Dans un milieu acide le fer est dissocié du complexe fer-transferrine. Le fer libre est réduit sous sa forme bivalente (ion ferreux) sous l'action de l'acide ascorbique. Les ions ferreux donnent un complexe coloré en réagissant avec la ferrozine (**Itano, 1978**).



- **Réactifs utilisés**

Réactifs	Composition	Concentration
R₁ (Tampon)	Acetate pH 4.9	100 mmol/l
R₂ (Réducteur)	Acide ascorbique	99.7%
R₃ (Solution chromogène)	Ferrozine	40 mmol/l
Étalon	Fer	100 µg/l

Pour préparer le réactif de travail on a dissout le contenu du tube du réactif R₂ dans le flacon du réactif R₁. Le mélange est stable trois mois à 2-8°C.

- **Échantillon** : sérum.

- **Mode opératoire**

Réactifs	Réactif de travail Blanc	Étalon	Échantillon Blanc	Échantillon
Réactif de travail (ml)	1.0	1.0	1.0	1.0
R ₃ (gouttes)	1	1	-	-
H ₂ O distillée (µl)	200	-		
Étalon (µl)	-	200	-	-
Échantillon (µl)	-	-	200	200

On mélange et on incube cinq minutes à 37 °C ensuite l'absorbance est mesurée à 562 nm.

- **Calcul de la concentration**

$$\text{Fer } (\mu\text{g/dl}) = \frac{(A)\text{échantillon} - (A)\text{Blanc}}{(A)\text{étalon}} \times 100 \mu\text{g/dl (concentration de l'étalon).}$$

5.7. Exploration du stress oxydant

Tous les réactifs chimiques utilisés ont pour origine Sigma chemical Co. (USA)

5.7.1. Préparation de l'homogénat

Un gramme de chaque organe étudié des rats des différents groupes expérimentaux, a été broyé et homogénéisé dans 2 ml du tampon TBS (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7.4) à l'aide d'un homogénéisateur (Ultra-Turax), puis centrifugé à 9000 tours /min à -4°C pendant 15 min. Le surnageant obtenu est aliquoté dans des tubes eppendorfs et conservé à -20°C en attendant d'effectuer les dosages des paramètres du stress oxydant.

5.7.2. Dosage des protéines

- **Principe**

Le dosage des protéines est déterminé selon la méthode de **Bradford, (1976)**, qui utilise le Bleu de Coomassie G250 (BBC) comme réactif. Ce dernier, réagit avec les groupements amines (-NH₂) 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 595 nm (à l'aide d'un spectrophotomètre UV/ visible Jenway 6305).

- **Mode opératoire**

- Prélever 0.1 ml de l'homogénat.
- Ajouter 5 ml de bleu brillant de Coomassie (BBC) (G250).
- Agiter et laisser le mélange à température ambiante pendant 5 min pour la stabilisation de la couleur.
- Mesurer l'absorbance de l'échantillon à 595 nm contre le blanc contenant la solution de tampon phosphate à la place de l'homogénat.

La densité optique obtenue est rapportée sur la courbe d'étalonnage (1mg/ml de BSA) préalablement réalisée dans les mêmes conditions, en utilisant le sérum albumine bovin (BSA) comme standard (Figure 14).

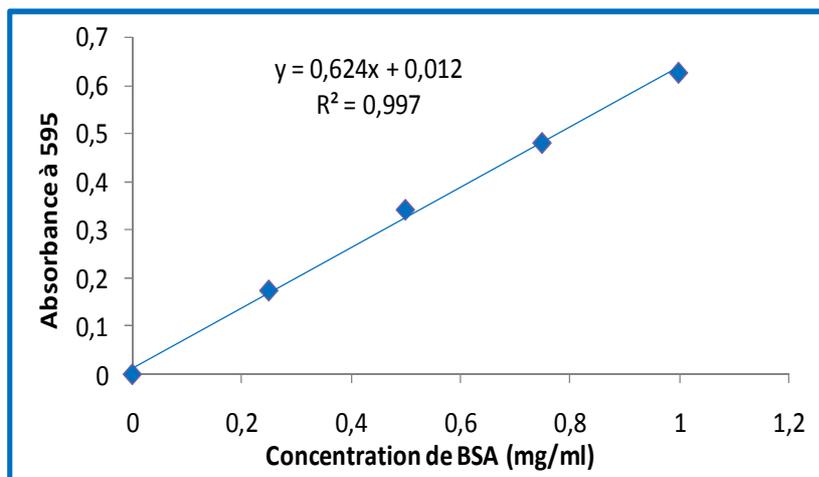


Figure 14 : Courbe d'étalonnage de la BSA (1mg/ml).

5.7.3. Détermination du taux de glutathion réduit (GSH)

- **Principe**

Le dosage du glutathion réduit (GSH) a été réalisé selon la méthode **d'Ellman, (1959)**, avec quelques modifications (**Jollow et al., 1974**). Le principe de ce dosage repose sur la mesure de l'absorbance optique de l'acide 2-nitro-5-marcapturique qui résulte de la réduction de l'acide 5-5-dithio-bis-2-nitrobenzoïque (DTNB) par les groupements (-SH) 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 5 min.
- Prélever 0.5 ml du surnageant.
- Ajouter 1ml du tampon Tris-EDTA (contenant 0.4 M de Tris, 0.02 M 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 minutes à une température ambiante et lire les densités optiques à 412 nm 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 :

$$\text{GSH (nmol GSH/mg protéine)} = \frac{\text{DO} \times 1 \times 1.525}{13100 \times 0.8 \times 0.5 \text{ mg protéine}}$$

DO: Densité optique.

1: Volume total des solutions utilisées de 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 après déprotéinisation trouvé dans un 1 ml.

0.5 : Volume du surnageant trouvé dans un 1.525 ml.

5.7.4. Détermination du taux de la malondialdéhyde (MDA)

- **Principe**

Le dosage de la malondialdéhyde (MDA) est réalisé selon la méthode de **Buege et Aust, (1984)**. Le principe de ce dosage est basée sur la formation d'une réaction entre les fonctions aldéhydes de la MDA libérées par l'hydrolyse acide à 80°C et l'acide thiobarbiturique (TBA) donnant un complexe de couleur rose qui peut être donc mesurer par spectrophotométrie d'absorption à 530 nm (figure 15).

- **Mode opératoire**

- Prélever 375 µl de l'homogénat (surnageant).
- Ajouter 150 µl de la solution tampon TBS (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7.4).
- Ajouter 375 µl de la solution TCA-BHT (TCA 20%, BHT 1%).
- Vortexer et Centrifuger à 1000 tours/min pendant 10 minutes à 4°C.
- Prélever 400 µl du surnageant.
- Ajouter 80 µl du HCl (0.6 M).
- Ajouter 320 µl de la solution Tris-TBA (Tris 26 mM, TBA 120 mM).
- Mélanger et incuber au bain marie à une température de 80°C pendant 10 minutes.
- Lire les densités optiques à 530 nm contre le blanc réactif.

- **Calcul de la concentration**

On calcule la concentration de MDA exprimée en nanomoles par milligramme de protéines (nmol/mg prot) selon l'équation:

$$\text{MDA (nmol/mg protéine)} = \frac{\text{DO} \times 10^6}{\text{E} \times \text{L} \times \text{X} \times \text{Fd}}$$

C : Concentration en nmol/mg de protéines.

DO : Densité optique lue à 530 nm.

E : Coefficient d'extinction molaire du MDA = $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

L : Longueur du trajet optique = 0.779 cm.

X : Concentration de l'extrait en protéines (mg/ml).

Fd : Facteur de dilution : Fd = 0.2083.

5.7.5. Détermination de l'activité enzymatique du glutathion peroxydase (GPx) (E.C. 1.11.1.9)

• **Principe**

L'activité enzymatique de la glutathion peroxydase (GPx) a été mesurée par la méthode de **Flohe et Gunzler, (1984)**. Cette méthode est basée sur la réduction de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) en présence de glutathion réduit (GSH). Ce dernier est transformé en (GSSG) sous l'influence de la GPx selon la réaction suivante :



• **Mode opératoire**

- Prélever 0.2 ml de l'homogénat.
- Ajouter 0.4 ml de GSH (0.1 mM).
- Ajouter 0.2 ml de la solution tampon TBS (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7.4).
- Incuber au bain marie à 25°C, pendant 5 minutes.
- Ajouter 0.2 ml de H₂O₂ (1.3 mM) pour initier la réaction et laisser agir pendant 10 minutes.
- Ajouter 1ml de TCA (1%) pour arrêter la réaction et laisser pendant 30 min dans un bain de glace.
- Centrifuger à 3000 tours/min durant 10 minutes.
- Prélever 0.48 ml du surnageant.
- Ajouter 2.2 ml de la solution tampon TBS (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7.4).
- Ajouter 0.32 ml de DTNB (1.0 mM).
- Mélanger et après 5 minutes lire les densités optiques à 412 nm.

• **Calcul de l'activité enzymatique**

L'activité enzymatique de la GPx est exprimée en nanomoles de GSH oxydé par milligramme de protéines (nmol GSH/mg prot) selon l'équation :

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

DO échantillon: Densité optique de l'échantillon, **DO étalon:** Densité optique de l'étalon.

0.04: Concentration de substrat (GSH).

5.7.6. Détermination de l'activité enzymatique de la catalase (E.C.1.11.1.6)

- **Principe**

La méthode d'Aebi, (1974) a été utilisée pour déterminer l'activité de la catalase. Le principe de cette méthode consiste à mesurer la variation de la densité optique à 240 nm consécutive à la dismutation du peroxyde d'hydrogène en faisant réagir dans le tampon phosphate (100 mM) et H₂O₂ (500 mM) pendant 1 minutes à pH 7.4 à une température d'incubation de 25°C.

- **Mode opératoire**

Réactif	Blanc	Échantillon
Tampon phosphate (100mM, pH7.5) (μl)	800	780
H ₂ O ₂ (500mM) (μl)	200	200
Homogénat (μl)	-	20

- **Calcul de l'activité enzymatique**

L'activité enzymatique de la catalase est exprimée en micromoles de H₂O₂ par minute par milligramme de protéines (μmol H₂O₂/min/mg prot) selon la formule suivante :

$$\text{Catalase } (\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{min/mg protéine}) = \frac{\Delta\text{DO} /_{\text{min}}}{\epsilon \times X \times L \times 0.02}$$

ϵ : Coefficient d'extinction moléculaire de l'eau oxygénée, $\epsilon \text{ H}_2\text{O}_2 = 0.043 \text{ mM}^{-1}.\text{cm}^{-1} = 0,043 \mu\text{mol cm}^{-1}.\text{ml}^{-1}$.

L : Trajet optique de la cuve = 0.779 cm.

X : Concentration de protéines en mg/ml.

5.7.7. Détermination de l'activité enzymatique de la superoxyde dismutase (SOD) (E.C.1.15.1.1)

- **Principe**

L'activité enzymatique de la superoxyde dismutase est déterminée par la méthode de **Asada et al., (1974)**. Le principe de cette méthode est basé sur l'oxydation du NBT (Nitrobleu tétrazolium) par l'anion superoxyde O₂⁻, ce dernier formé par la réaction de photo-réduction du complexe riboflavine/méthionine. Dans un milieu aérobie, le mélange riboflavine, méthionine et NBT donne une coloration bleuâtre. La présence de SOD inhibe l'oxydation du NBT.

- **Mode opératoire**

Réactif	Blanc	Étalon	Échantillon
EDTA-Met (0.3mM) (µl)	1000	1000	1000
Tampon phosphate (50mM, pH7.8) (µl)	892.2	892.2	892.2
Échantillon (µl)	-	-	50
Tampon phosphate (50mM, pH7.8) (µl)	1000	1000	950
NBT (2.64mM) (µl)	85.2	85.2	85.2
Riboflavine (0.26Mm) (µl)	22.6	22.6	22.6

Incuber les cuves contenant l'échantillon ainsi que la cuve du blanc sous une lampe de bureau (source lumineuse) pendant 20 minutes. Lire la densité optique à 560 nm

- **Calcul de l'activité enzymatique**

L'activité enzymatique de la SOD est exprimée en Unité enzymatique par milligramme de protéines (U/mg de prot) selon la formule :

$$\text{SOD (U/mg de protéine)} = \left[\frac{(\text{DO}_{\text{Blanc}} - \text{DO}_{\text{échantillon}})}{\text{DO}_{\text{Blanc}}} \times 100 \right] \times 20$$

6. Etude histologique

Les coupes histologiques ont été réalisées suivant la technique classique de **Houlot, (1984)**.

Le pancréas de chaque rat est retiré du formol puis coupé à l'aide de couteaux tranchants afin de réaliser des prélèvements pour l'étude histologique avec une surface de 1 à 2 cm² et une épaisseur proche de 1.5mm. Les prélèvements réalisés sont alors mis dans des cassettes spéciales à parois tournées afin de permettre le passage des liquides.

- **Déshydratation**

Avant d'être coulé dans un moule contenant de la paraffine les prélèvements ont d'abord subi une déshydratation par immersion dans des bains d'éthanol de concentration croissante (70%, 80%,90%,100%).

- **Réalisation des blocs**

Après déshydratation les échantillons sont d'abord imprégnés de paraffine par passage dans plusieurs bains puis inclus dans des blocs appropriés dont le fond contient de la paraffine. 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**

Elles sont faites à l'aide d'un microtome permettant de réaliser des tranches de section de 2 à 5 µm d'épaisseur. Les coupes sont recueillies sur des lames de verre et fixées par l'utilisation d'une eau gélatineuse chauffée.

- **Coloration**

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

- Déparaffiner et hydrater les lames à l'eau du robinet puis rincer à l'eau distillée.
- Immerger dans un bain d'Hématoxyline de Harris (15 minutes) qui colore en bleu violacée les structures basophiles (noyaux).
- Différencier les coupes dans l'alcool acide (1 à 2 plongées), déposer ensuite les lames dans un bain d'eau du robinet et vérifier la différenciation au microscope.
- Bleuir dans un bain d'eau ammoniacale.
- Immerger dans un bain d'Eosine (15 secondes à 2 minutes) qui colore les structures acidophiles (cytoplasme).
- déshydrater, éclaircir et monter les lames à Eukitt. Tous ces bains sont séparés par des lavages à l'eau du robinet.
- Enfin, passer à l'observation au microscope photonique, équipé d'un appareil photographique.

7. Traitement statistique des résultats

Les résultats ont été rassemblés dans des tableaux, exprimés sous forme de moyenne plus ou moins l'écart type et illustrés par des diagrammes en bâtons, les moyennes sont comparées par le teste d'ANOVA suivi par le test t de Student.

Nous avons effectués deux comparaisons :

- Les groupes traités (NaF, NaF+AG, NaF+PG, NaF+AG+PG et PG) 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 (NaF+AG, NaF+PG, NaF+AG+PG et PG) par rapport au groupe traité (NaF) : # : 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.

RESULTATS ET DISCUSSION

Chapitre I : Activité antioxydante et teneur en composés phénoliques.

I.1. Activité antioxydante

La détermination de l'activité antioxydante du jus de *Punica granatum* sur le radical DPPH, montre que la valeur de IC₅₀ est de 31,15 %, alors que l'activité de ce jus sur les radicaux superoxydes est de 21,7 % (Tableau 02).

I.2. Teneur en composés phénoliques

Notre étude a montré que la teneur en phénols est 0,35 mg (mg acide gallique/g d'extrait), tandis que celle en flavonoïdes est 0,21 mg (exprimé en mg de quercétine par gramme de l'échantillon). Elle montre également que le jus de *Punica ganatum* contient 0,54 mg des tanins (mg catéchine/g).

Tableau 02 : Activité antioxydante et teneur en phénols totaux (mg AG/g), flavonoïdes (mg Qerc/g) et tanins (mg Catch/g) du jus de *Punica ganatum*.

DPPH IC ₅₀ (%)	Superoxide IC ₅₀ (%)	Phénols totaux (mg AG/g)	Flavonoïdes (mg Qerc/g)	Tanins (mg Catch/g)
31,15 ±0,16	21,7 ±1,28	0,35 ±0,002	0,21 ±0.004	0,54 ±0,004

AG : Acide gallique.

Qerc : Quercétine.

Catch : Catéchine.

❖ Discussion

L'utilisation des plantes pour leurs vertus médicinales est une pratique très vieille qui trouve ces origines dans les plus anciennes civilisations. Actuellement il est largement connu que le monde végétal constitue une source potentielle de substances biologiquement actives qu'on les trouve depuis les racines jusqu'aux fruits. Il s'agit de plusieurs métabolites secondaires présents à faibles doses dans les plantes et qui n'exercent pas de fonction directe au niveau des activités fondamentales de l'organisme végétal comme la croissance et la reproduction, mais procurent aux plantes des propriétés curatives appréciables qu'aucune chimie synthétique ne peut nous offrir. La science moderne en analysant et étudiant les effets thérapeutiques des plantes a pour but de classer leurs diverses propriétés pour grouper celles à effets similaires, on distingue : les plantes tonifiantes, analgésiques, sédatives, antioxydantes...etc (Szablocs, 2004 ; Clement, 2005).

Aujourd'hui, il est bien prouvé expérimentalement que les antioxydants d'origine végétale notamment les polyphénols, sont des molécules qui possèdent des propriétés allant bien au-delà de leur capacité de piéger les ERO. En effet, ils peuvent augmenter la réponse immunitaire, diminuer l'expression d'oncogènes et inhiber l'angiogenèse des cellules tumorales. Ils jouent également un rôle clé dans la régulation des signaux cellulaires (transcription des gènes pro et anti-apoptotiques et inflammatoire ou de gènes codants pour l'expression d'enzymes antioxydantes) (Pincemail *et al.*, 2002 ; Rosenblat *et al.*, 2006).

Dans un premier temps, et à travers l'analyse phytochimique du jus de *Punica granatum*, notre étude a montré la présence de taux variables de polyphénols, de flavonoïdes et des tanins. Ces composés sont largement connus pour leurs propriétés antioxydantes.

Les résultats de plusieurs autres études ont montré également que toutes les parties de la plante sont riches en ces composés, ce qui confère à cette espèce une importante activité anti-radicalaire (Changjiang *et al.*, 2003). En effet, Li *et al.*, (2006) ont trouvé des phénols, des flavonoides et même de la vitamine C dans l'écorce de *Punica granatum*. Ces derniers ont prouvé que la teneur en composés phénoliques est plus importante dans l'écorce par rapport

la pulpe. De plus, **Kaur et al., (2006)** ont montré que l'extrait éthanolique des fleurs de cette espèce contient aussi une quantité importante des polyphénols.

Le DPPH est radical très utilisé pour la détermination de l'activité antiradicalaire des molécules antioxydantes. Nos échantillons montre un maximum d'inhibition de 31,15% pour ce radicale. Cet effet semble être lié à la présence des polyphénols, des flavonoïdes et des tanins qui peuvent agir comme donneur d'électron et qui réagissent avec le radical DPPH et le rendre plus stable. En effet, l'étude phytochimique effectuée par **Belkacem et al., (2014)** a montré que les constituants majoritaires de plusieurs extraits de l'écorce de *Punica granatum* sont les polyphénols, les flavonoïdes et les tanins, elle a montré aussi que l'activité antioxydante (évaluée par la capacité de piégeage du radicale DPPH) de différents extrais est fortement corrélée avec leurs teneurs en ces composés.

Dans notre étude, le pouvoir scavengeur du jus de *Punica granatum* vis-à-vis du radical superoxyde a été également évalué en suivant la diminution de la réduction de NBT en formasan. Nos échantillons montrent un maximum d'inhibition de 21,7%, alors que **Li et al., (2006)** ont enregistrée une activité inhibitrice de cet anion de 43,0% et 37,7% pour l'écorce et la pulpe respectivement. Cet effet semble être lié à la présence des polyphénols, des flavonoïdes et des tanins.

Chapitre II : Impact du fluorure de sodium sur quelques paramètres physiologiques, hématologiques et effet protecteur de la supplémentation en acide gallique et/ou le jus de *Punica granatum*.

II.1. Action sur le poids corporel

Nos résultats montrent une augmentation du poids corporel chez tous les lots expérimentaux. Aucune différence n'a été enregistrée entre ces lots (Tableau 03).

II.2. Actions sur le poids relatif des organes

- **Foie** : Les résultats obtenus indiquent une augmentation significative du poids relatif du foie chez le lot NaF par rapport au témoin. Parallèlement, ils montrent une diminution non significative chez le lot NaF+AG, NaF+PG et NaF+AG+PG comparativement au groupe NaF (Tableau 03, Figure 15).
- **Reins** : Aucune différence significative n'a été enregistrée entre le lot témoin et les autres lots expérimentaux (Tableau 03, Figure 15).
- **Cœur** : L'analyse statistique des résultats n'a révélé aucune différence significative entre les lots expérimentaux (Tableau 03, Figure 15).
- **Testicules** : Nos résultats illustrent une augmentation significative et très hautement significative chez le groupe NaF+AG+PG et le groupe NaF+PG respectivement par rapport au témoin (Tableau 03, Figure 15).

Tableau 03 : Variation du poids corporel (g) et du poids relatif (g/100g de poids corporel) des organes (foie, reins, cœur et testicules) chez les rats témoins et les rats traités.

Paramètres	Lots expérimentaux					
	Témoin	NaF	NaF+AG	NaF+PG	NaF+AG+PG	PG
Poids initial (g)	236,33±51,34	237,67±31,38	240,5±21,81	242,5±21,03	242,67±51,62	241,67±26,27
Poids final (g)	311,17±54,61	349±35,88	322±25,61	310,83±22,94	329,5 ±86,81	320,17±24,19
%		12,16	3,48	-0,10	5,89	2,89
%			-7,73	-10,94	-5,59	
Gains poids (g)	74,83	111,13	81,5	68,33	86,83	78,5
Poids relatif du foie (g/ 100g PC)	2,63±0,17	3,09±0,46*	2,75±0,25	2,81±0,21	2,91 ±0,23	2,74±0,14
%		17,49	4,56	6,84	10,64	4,18
%			-11	-9,06	-5,82	
Poids relatif des reins (g/ 100g PC)	0,55±0,02	0,53±0,03	0,53±0,03	0,55±0,04	0,54 ±0,06	0,54±0,03
%		-3,64	-3,64	0	-1,82	-1,82
%			0,95	3,80	2,66	
Poids relatif du cœur (g/ 100g PC)	0,31±0,04	0,28±0,01	0,29±0,02	0,31±0,04	0,3 ±0,03	0,31±0,02
%		-9,68	-6,45	0	-3,23	0
%			3,57	10,71	7,14	
Poids relatif des testicules (g/ 100g PC)	0,59±0,23	0,76±0,19	0,86±0,22	0,99±0,18***	0,8 ±0,17*	0,81±0,14
%		28,81	45,76	67,8	35,59	37,29
%			13,16	30,26	5,26	

* : Différence significative par rapport au témoin ($p \leq 0.05$), *** : Différence très hautement significative par rapport au témoin ($p \leq 0.001$).

p : Seuil de signification

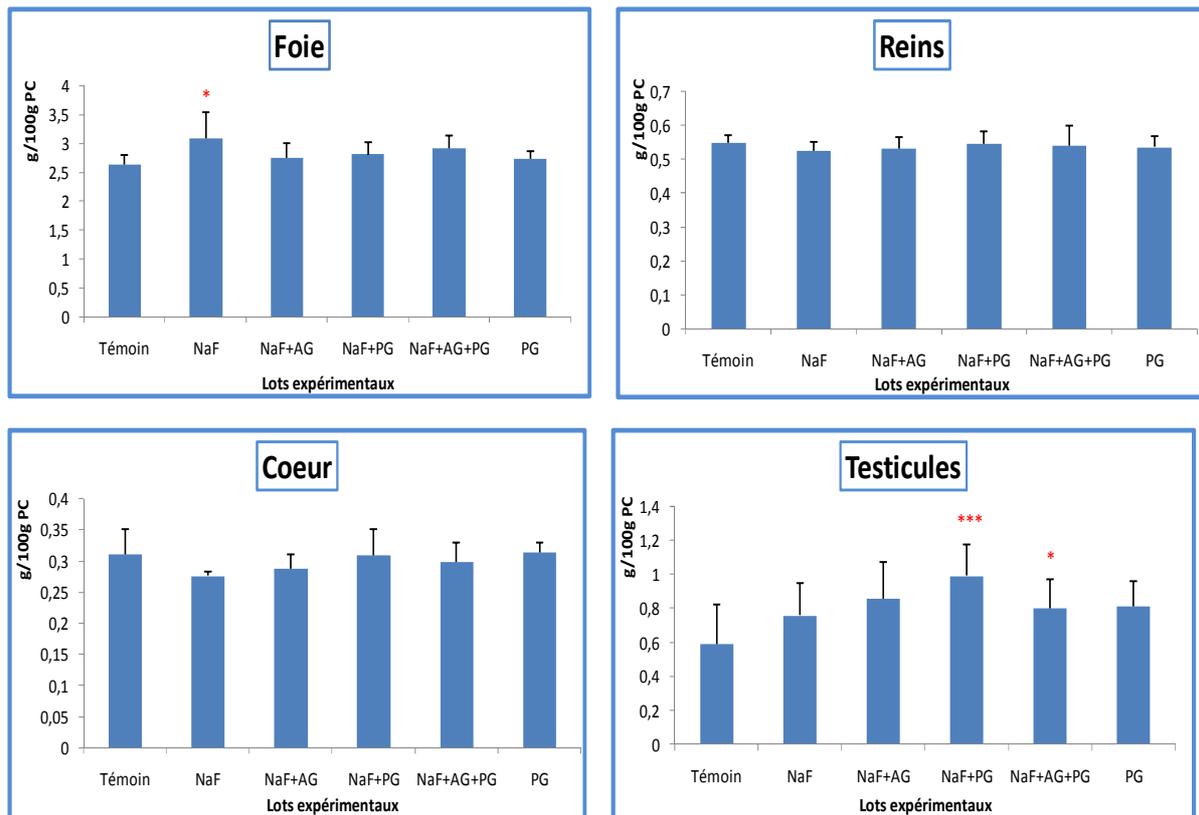


Figure 15 : Variation du poids relatif (g/100g de poids corporel) des organes (foie, reins et testicules) chez les rats témoins et les rats traités.

* : Différence significative par rapport au témoin ($p \leq 0,05$), *** : Différence très hautement significative par rapport au témoin ($p \leq 0,001$).

p : Seuil de signification.

3. Variation de la quantité d'aliment consommée

Aucune différence significative n'a été enregistrée entre les rats du groupe NaF et les rats témoins (Figure 16). En revanche le traitement des rats par l'acide gallique ou le jus de *Punica granatum* à provoqué une diminution très hautement significative de la quantité d'aliment consommée par rapport aux rats traités par le NaF (Tableau 04).

4. Variation de la quantité d'eau consommée

Le traitement des rats par le NaF a causé une baisse significative de la quantité d'eau consommée comparativement aux rats témoins (Figure 16). Tandis que le traitement par jus du *Punica granatum* a provoqué une augmentation très hautement significative par rapport aux rats traités par le NaF (Tableau 04).

Tableau 04 : Variation de la quantité d'aliment (g/rat/jour) et de la quantité d'eau (ml/rat/jour) consommées ainsi que la quantité d'NaF ingérée (mg/rat/jour) chez les rats témoins et les rats traités.

Paramètres	Lots expérimentaux					
	Témoin	NaF	NaF+AG	NaF+PG	NaF+AG+PG	PG
Quantité d'aliment consommée (g/rat/j)	21,36±2,58	22,95±1,34	20,78±0,93 ^{####}	20,63±0,98 ^{####}	22,01±1,1 [#]	20,9±2,21
%		7,44	-2,71	-3,42	3,04	-2,15
%			-9,45	-10,11	-4,1	
Quantité d'eau consommée (ml/rat/j)	28,64±0,89	23,41 [*] ±0,33	19,47±0,32 ^{#####}	29,82±0,21 ^{####}	24,04±0,63	29,28±0,3
%		-18,26	-32,02	4,12	-16,06	2,24
%			-16,83	27,38	2,69	
Quantité d'NaF ingérée (mg/rat/j)		0,23±0,03	0,19±0,03	0,3±0,02	0,24±0,06	

* : Différence significative par rapport au témoin ($p \leq 0,05$), *** : Différence très hautement significative par rapport au témoin ($p \leq 0,001$), # : Différence significative par rapport au NaF ($p \leq 0,05$), #### : Différence très hautement significative par rapport au NaF ($p \leq 0,001$).

p : Seuil de signification.

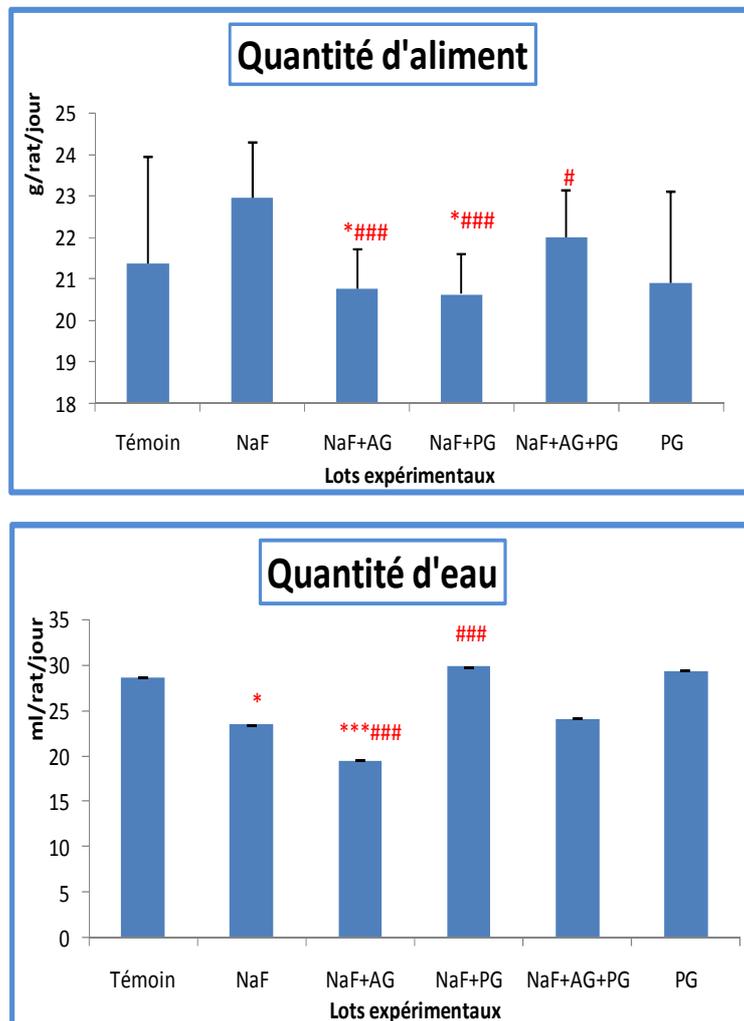


Figure 16 : Variation de la quantité d'aliment (g/rat/jour) et de la quantité d'eau (ml/rat/jour) consommées chez les rats témoins et les rats traités.

* : Différence significative par rapport au témoin ($p \leq 0,05$), *** : Différence très hautement significative par rapport au témoin ($p \leq 0,001$), # : Différence significative par rapport au NaF ($p \leq 0,05$), ### : Différence très hautement significative par rapport au NaF ($p \leq 0,001$).

p : Seuil de signification.

5. Variation des paramètres hématologiques

- **Nombre des globules rouges (GR)**

Les résultats illustrés par le tableau 05 et la figure 17 indiquent une diminution significative du nombre des globules rouges chez le lot NaF et hautement significative chez le lot PG comparativement au témoin. La baisse enregistrée chez les lots NaF+AG, NaF+PG et NaF+AG+PG par rapport au témoin est statistiquement non significative.

- **Nombre des globules blanc (GB)**

Selon nos résultats, une augmentation significative est enregistrée chez les rats du lot NaF ainsi que chez ceux du groupe NaF+AG+PG par rapport au témoin. Le traitement des rats par l'acide gallique ou par *Punica granatum* a normalisé le nombre des globules blanc (Tableau 05, Figure 17).

- **Volume globulaire moyen (VGM)**

Les résultats obtenus et rassemblés dans le tableau 05 montrent une diminution non significative chez le groupe NaF comparativement au témoin. Ils montrent également une augmentation statistiquement non significative chez le lot NaF+AG et le lot NaF+PG par rapport au lot NaF, alors qu'elle est significative chez le lot traité par la combinaison (NaF+AG+PG) comparativement au même lot.

- **Taux de l'hémoglobine (Hb)**

L'étude statistique des résultats a montré que l'administration du NaF aux rats a provoqué une diminution hautement significative du taux de l'hémoglobine par rapport au témoin. Tandis que le traitement par l'acide gallique, le *Punica granatum* ou leur combinaison a normalisé ce taux (Tableau 05, Figure 17).

- **Taux de l'hématocrite (Ht)**

Nos résultats indiquent une baisse significative du taux de l'hématocrite chez les rats du groupe NaF comparativement au témoin. Les résultats indiquent également que le traitement des rats par le NaF plus l'acide gallique ou le *Punica granatum* a amélioré ces taux. Cette amélioration est plus remarquable chez le lot traité par la combinaison NaF+AG+PG (Tableau 05, Figure 17).

Tableau 05 : Variation du nombre des globules rouges ($\times 10^6 / \mu\text{l}$) et des globules blanc ($\times 10^3 / \mu\text{l}$), du VGM (fl), et du taux de l'hémoglobine (g/dl) et de l'hématocrite (%) chez les rats témoins et les rats traités.

Paramètres	Lots expérimentaux					
	Témoin	NaF	NaF+AG	NaF+PG	NaF+AG+PG	PG
Globules rouges ($\times 10^6 / \mu\text{l}$)	8,96 \pm 0,32	8,61 \pm 0,11*	8,66 \pm 0,37	8,74 \pm 0,53	8,89 \pm 0,48	8,44 \pm 0,29**
%		-3,91	-3,35	-2,45	-0,78	-5,79
%			0,58	1,5	3,25	
Globules blancs ($\times 10^3 / \mu\text{l}$)	10,32 \pm 1,81	12,82 \pm 2,26*	10,52 \pm 0,84##	9,78 \pm 1,23##	13,17 \pm 2,8*	10,33 \pm 1,84
%		24,23	1,94	-5,23	27,62	0,1
%			-17,94	-23,71	2,73	
VGM (fl)	49,67 \pm 1,75	47,17 \pm 1,94	49,33 \pm 1,37	48,67 \pm 1,37	50,17 \pm 1,72#	49,33 \pm 0,52
%		-5,03	-0,68	-2,01	1,01	-0,68
%			4,59	3,18	6,36	
Taux de l'hémoglobine (g/dl)	14,82 \pm 0,59	13,58 \pm 0,36**	14,28 \pm 0,36#	14,78 \pm 0,35###	14,95 \pm 0,7#	14,37 \pm 0,34
%		-8,37	-3,64	-0,27	0,89	-3,03
%			5,15	8,84	10,09	
Taux de l'hématocrite (%)	44,55 \pm 1,33	42,37 \pm 1,21*	42,82 \pm 1,23	43,23 \pm 2,65	44,6 \pm 2,18#	42,53 \pm 3,10
%		-4,90	-3,88	-2,96	0,22	-4,53
%			1,06	2,03	5,26	

* : Différence significative par rapport au témoin ($p \leq 0,05$), ** : Différence hautement significative par rapport au témoin ($p \leq 0,01$), # : Différence significative par rapport au NaF ($p \leq 0,05$), ## : Différence hautement significative par rapport au NaF ($p \leq 0,01$), ### : Différence très hautement significative par rapport au NaF ($p \leq 0,001$).

p : Seuil de signification

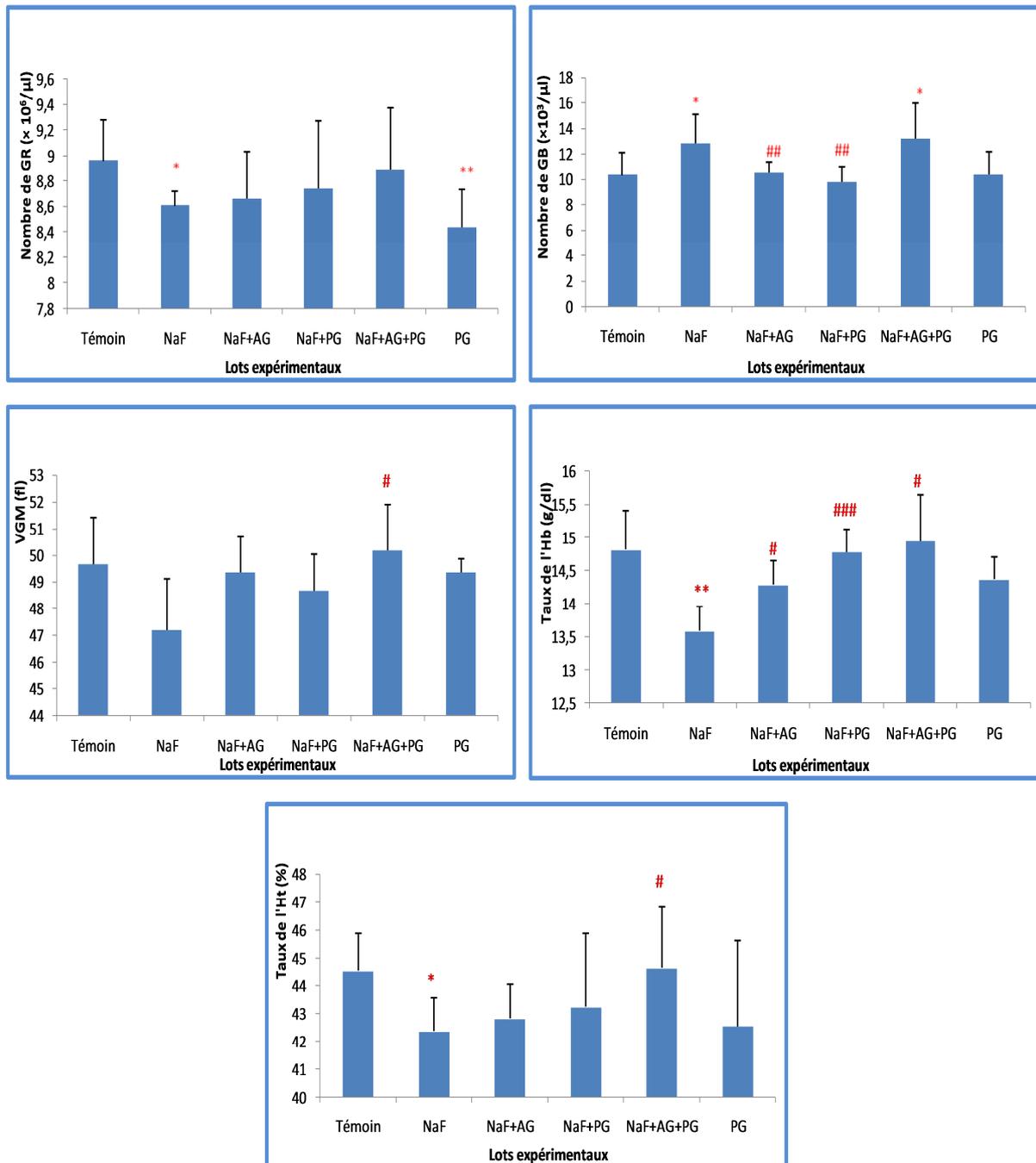


Figure 17 : Variation du nombre des globules rouges ($\times 10^6/\mu\text{l}$) et des globules blanc ($\times 10^3/\mu\text{l}$), du VGM (fl), et du taux de l'hémoglobine (g/dl) et de l'hématocrite (%) chez les rats témoins et les rats traités.

* : Différence significative par rapport au témoin ($p \leq 0,05$), ** : Différence hautement significative par rapport au témoin ($p \leq 0,01$), # : Différence significative par rapport au NaF ($p \leq 0,05$), ## : Différence hautement significative par rapport au NaF ($p \leq 0,01$), ### : Différence très hautement significative par rapport au NaF ($p \leq 0,001$).

p : Seuil de signification.

- **Concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (CCMH)**

Le traitement statistique des résultats n'a pas montré aucune différence entre les six lots expérimentaux (Tableau 06, Figure 18).

- **Teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine (TCMH)**

Aucune différence statistiquement significative n'a été enregistrée entre les lots expérimentaux (Tableau 06, Figure 18).

- **Taux des plaquettes (Plt)**

Les résultats obtenus montrent une diminution significative des plaquettes chez le groupe NaF par rapport au groupe témoin. Par ailleurs, le traitement des rats par l'acide gallique et/ou le *Punica granatum* a normalisé leurs valeurs (Tableau 06, Figure 18).

6. Effet sur la concentration en fer sérique (Fe)

Nos résultats montrent une augmentation très hautement significative chez le lot NaF par rapport au témoin. Le traitement des rats par le NaF plus l'acide gallique ou le *Punica granatum* a provoqué une diminution très hautement significative comparativement aux rats traités par le fluorure de sodium uniquement (Tableau 06, Figure 18).

Tableau 06 : Variation de la CCMH (g/dl), de la TCMH (pg), des plaquettes et du fer sérique (µg/dl) chez les rats témoins et les rats traités.

Paramètres	Lots expérimentaux					
	Témoin	NaF	NaF+AG	NaF+PG	NaF+AG+PG	PG
CCMH (g/dl)	33,27±0,46	33,47±0,46	33,37±0,33	34,88±2,67	33,45±0,28	33,53±0,25
%		0,6	0,3	4,84	0,54	0,78
%			-0,3	4,21	0,06	
TCMH (pg)	16,55±0,69	16,7±0,54	14,81±4,06	18,93±5,45	16,82±0,63	16,53±0,26
%		0,91	-10,51	14,38	1,63	-0,12
%			-11,32	13,35	0,72	
Plaquettes (10 ³ /µl)	721,66±79,97	590,33±63,7*	682,33±65,33 [#]	675±97,95	755,83±82,5 [#]	709±20,49
%		-18,2	-5,45	-6,46	4,73	-1,75
%			15,58	14,34	28,03	
Fer (µg/dl)	1,35±0,02	2,46±0,19***	1,49±0,07***###	1,51±0,08***###	1,83±0,4*	1,4±0,11
%		82,22	10,37	11,85	35,55	3,7
%			-39,43	-38,62	-25,61	

* : Différence significative par rapport au témoin (p≤0,05), ** : Différence hautement significative par rapport au témoin (p≤0,01), *** : Différence très hautement significative par rapport au témoin (p≤0,001), # : Différence significative par rapport au NaF (p≤0,05), ### : Différence très hautement significative par rapport au NaF (p≤0,001).

p : Seuil de signification.

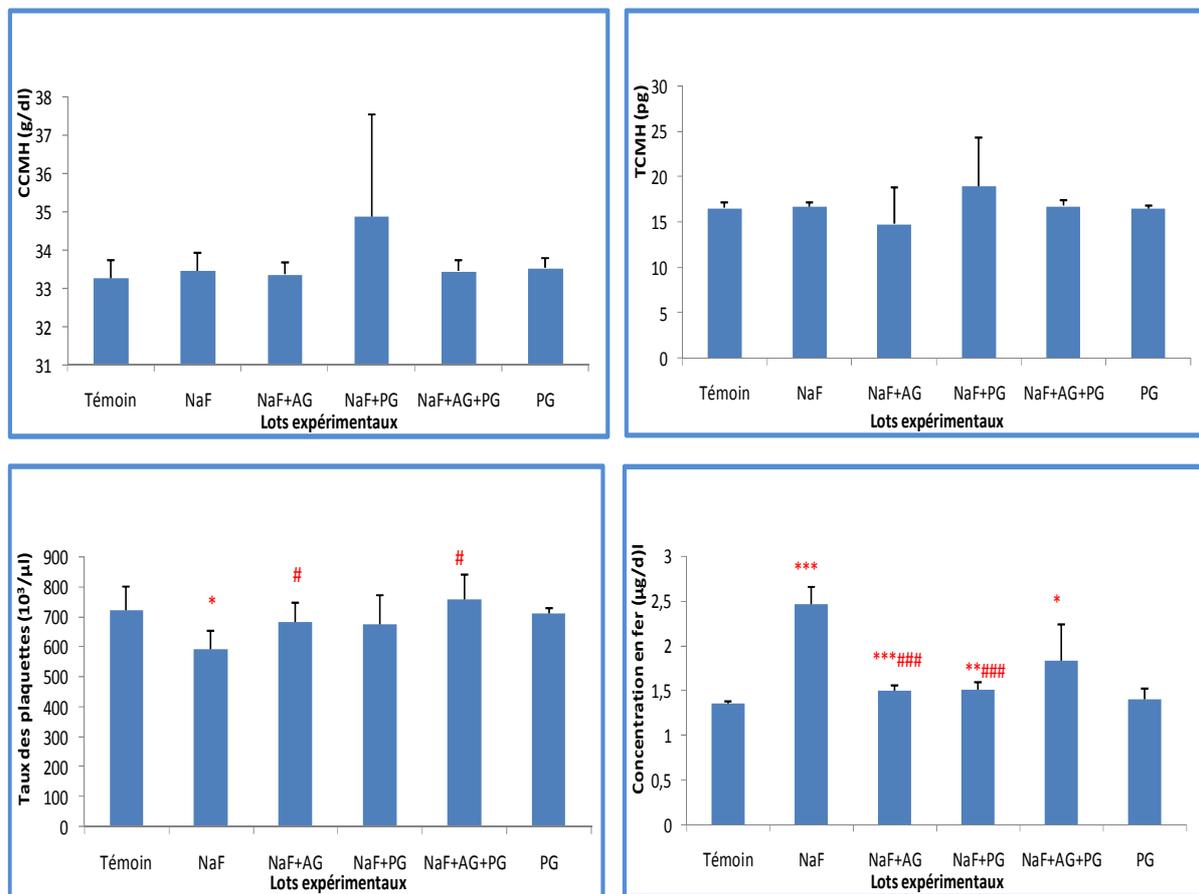


Figure 18 : Variation de la CCMH (g/dl), de la TCMH (pg), des plaquettes et du fer sérique (µg/dl) chez les rats témoins et les rats traités.

* : Différence significative par rapport au témoin ($p \leq 0,05$), ** : Différence hautement significative par rapport au témoin ($p \leq 0,01$), *** : Différence très hautement significative par rapport au témoin ($p \leq 0,001$), # : Différence significative par rapport au NaF ($p \leq 0,05$), ### : Différence très hautement significative par rapport au NaF ($p \leq 0,001$).

p : Seuil de signification.

❖ Discussion

Notre étude expérimentale a porté sur l'évaluation de l'effet antioxydant de 20 mg/ Kg PC de l'acide gallique et/ou 1 ml du jus de *Punica granatum* chez les rats Wistar traités par 100 ppm de fluorure de sodium.

Les résultats obtenus ont montré que l'exposition au fluorure de sodium n'a pas affecté le poids corporel des rats, par contre elle a provoqué une augmentation du poids relatif du foie. L'hypertrophie hépatique est causée par l'accumulation intense du NaF dans cet organe. **Simon et al., (1995)** a signalé que l'augmentation des poids absolus ou relatifs des organes des animaux et un indicateur de la toxicité des substances utilisées.

Nos résultats sont en accord avec ceux **d'Al-Hiyasat et al., (2000)** qui ont enregistré une augmentation du poids relatif des reins chez des rattes traitées par le fluorure de sodium.

L'addition du jus de *Punica granatum* et/ou de l'acide gallique aux rats traités par le fluorure de sodium a normalisé le poids relatif du foie. Ceci pourrait être expliqué par l'effet protecteur du jus de la grenade et de l'acide gallique contre la toxicité induite par le fluorure de sodium.

Nous avons également enregistré chez les rats traités par le fluorure de sodium une diminution de la consommation de l'eau de boisson. **Collins et al., (2001)** ont également enregistré une diminution de la consommation de l'eau de boisson chez des rats traités par le fluorure de sodium à 175 ppm et 250 ppm ; ils ont attribué cet effet à un changement du goût de l'eau.

L'effet hématotoxique du fluorure de sodium est prouvé par une d'une baisse du taux des globules rouges, de l'hémoglobine, de l'hématocrite ainsi que des plaquettes accompagnée d'une augmentation du taux du fer sérique, reflétant une anémie. Cette anémie pourrait être due à la toxicité du fluorure de sodium exercée au niveau rénal ce qui peut provoquer une baisse de la synthèse des érythrocytes suite à une inhibition de la synthèse de l'érythropoïétine (**Anjum et al., 2010**).

Agalacova et Gusev (2013) ont attribué l'anémie observée chez les rats traités par le fluorure de sodium à l'accélération de l'élimination des érythrocytes d'un côté, et à la transformation des érythrocytes en echinocytes, due à la dégénérescence membranaire d'un autre côté. Cette dégénérescence est probablement causée par l'action des radicaux libres sur la membrane érythrocytaire augmentant la peroxydation lipidique.

Il a été également rapporté que la perturbation du métabolisme du fer sérique participe à l'apparition d'une anémie hémolytique. Cette perturbation est probablement due à une compétition entre le fer et le fluorure de sodium sur le site de liaison à la transferrine ce qui entraîne un manque du fer au niveau de l'os, lieu de synthèse des érythroblastes.

Nos résultats sont en accord avec ceux de **Bouaziz et al., (2006_a)** qui ont montré que le fluorure de sodium peut altérer l'hématopoïèse chez les souris. En plus il a été prouvé que l'exposition chronique aux doses toxiques de fluorure de sodium provoque également une anémie chez l'Homme (**Susheela, 2001; Ersoy et al., 2010**).

Le co-traitement des rats par le jus de *Punica granatum* et/ou l'acide gallique a corrigé cette anémie. Cet effet est probablement lié à une activité antioxydante qui inhibe la lyse des globules rouges et l'altération des cellules rénales ce qui stimule la sécrétion de l'érythropoïétine et la restauration de l'érythropoïèse. Des résultats similaires ont été enregistrés par **Larossa et al., (2010)**. Ces derniers ont attribué l'effet hémato-protecteur de *Punica graatum* à la présence des tanins ellagiques.

Chapitre III : Impact du fluorure de sodium sur la fonction hépatique et effet protecteur de la supplémentation en acide gallique et/ou le jus de *Punica granatum*.

III.1. Concentration plasmatique en glucose

Selon les résultats obtenus et groupés dans le tableau 07, on remarque une augmentation hautement significative chez le lot NaF par rapport au témoin. On remarque également que le traitement par le jus de *Punica granatum* a normalisé la glycémie.

III.2. Concentration plasmatique en protéines totales

Nos résultats indiquent une baisse hautement significative des protéines totales chez le lot NaF par rapport au témoin. Par ailleurs, le traitement par l'acide gallique ou le *Punica granatum* a provoqué une augmentation significative par rapport au groupe NaF (Tableau 07, Figure 19).

III.3. Concentration plasmatique en albumine

Selon les résultats obtenus et rassemblé dans le tableau 07, on remarque et par rapport au témoin une baisse hautement significative de l'albumine chez le lot NaF. On remarque également une augmentation hautement significative chez le lot NaF+PG et NaF+AG+PG et très hautement significative chez le groupe NaF+ AG par rapport au lot NaF.

III.4. Concentration plasmatique en bilirubine totale

Le dosage de la bilirubine a montré une baisse hautement significative chez le lot NaF comparativement au témoin. Parallèlement une augmentation est enregistrée chez les lots traités par l'acide gallique et/ou le *Punica granatum*. Cette augmentation est statistiquement significative et très hautement significative chez le groupe NaF+PG et NaF+AG respectivement et comparativement au groupe NaF (Tableau 07, Figure 19).

Tableau 07 : Variation de la concentration plasmatique du glucose (mg/dl), des protéines totales (g/dl), de l'albumine (g/dl) et de la bilirubine totale (mg/dl) chez les rats témoins et les rats traités.

Paramètres	Lots expérimentaux					
	Témoin	NaF	NaF+AG	NaF+PG	NaF+AG+PG	PG
Glucose (mg/dl)	120,83±15,94	189,67±13,18**	94,83±13,38**	117±7,04#	112±21,08	102,33±12,22*
%		-25,79	-21,52	-3,17	-7,31	-15,31
%			5,75	30,49	24,9	
Protéines totales (g/dl)	92,69±4,2	73,33±5,59**	81,42±2,42**#	88,25±5,88**#	76,42±8,13**	82,03±5,81*
%		-20,9	-12,16	-4,79	-17,55	-11,5
%			11,03	20,35	4,21	
Albumine (g/dl)	43,09±3,2	32,96±3,27**	40,55±3,69###	45,59±2,16***	42,1±4,23##	41,37±2,25
%		-23,51	-5,89	5,8	-2,3	-3,99
%			23,03	38,32	27,73	
Bilirubine totale (mg/dl)	1,6±0,18	0,97±0,16**	1,74±0,14###	1,27±0,16**	1,22±0,37	1,62±0,15
%		-39,37	8,75	-20,62	-23,75	1,25
%			79,38	30,93	25,77	

* : Différence significative par rapport au témoin ($p \leq 0,05$), ** : Différence hautement significative par rapport au témoin ($p \leq 0,01$), # : Différence significative par rapport au NaF ($p \leq 0,05$), ## : Différence hautement significative par rapport au NaF ($p \leq 0,01$), ### : Différence très hautement significative par rapport au NaF ($p \leq 0,001$).
p : Seuil de signification.

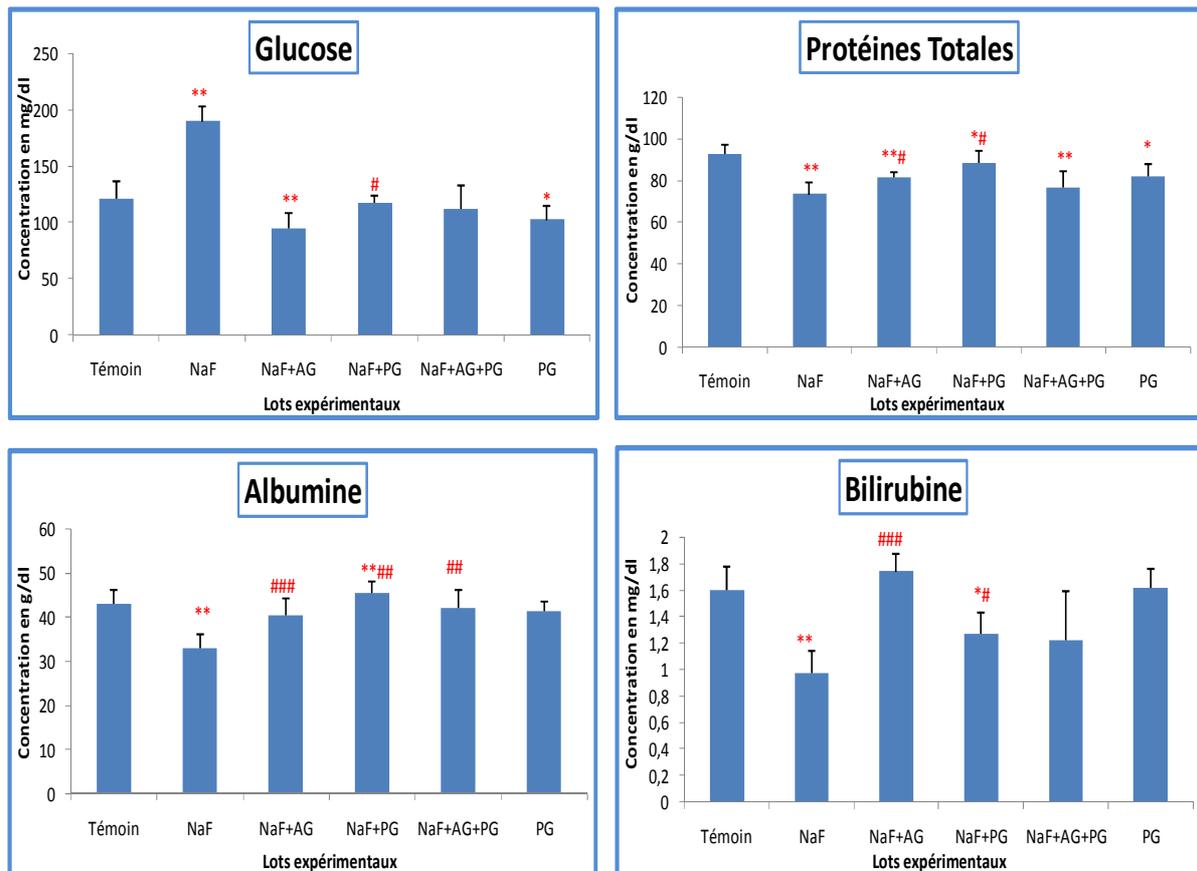


Figure 19 : Variation de la concentration plasmatique du glucose (mg/dl), des protéines totales (g/dl), de l'albumine (g/dl) et de la bilirubine totale (mg/dl) chez les rats témoins et les rats traités.

* : Différence significative par rapport au témoin ($p \leq 0,05$), ** : Différence hautement significative par rapport au témoin ($p \leq 0,01$), # : Différence significative par rapport au NaF ($p \leq 0,05$), ## : Différence hautement significative par rapport au NaF ($p \leq 0,01$), ### : Différence très hautement significative par rapport au NaF ($p \leq 0,001$).

p : Seuil de signification.

III.5. Activité de l'aspartate aminotransférase (ASAT)

Nos résultats illustrent une augmentation hautement significative chez le lot NaF par rapport au témoin. Par contre le traitement des rats par l'acide gallique, le *Punica granatum* ou leur combinaison à normalisé l'activité de l'ASAT (Tableau 08, Figure 20).

III.6. Activité de l'alanine aminotransferase (ALAT)

Les résultats obtenus montrent une augmentation très hautement significative de l'activité enzymatique de l'ALAT chez le groupe NaF comparativement au témoin. Parallèlement, l'administration de l'acide gallique et/ou la *Punica granatum* a provoqué une baisse statistiquement hautement significative chez le groupe NaF+PG et très hautement significative chez le lot NaF+AG et le groupe NaF+AG+PG (Tableau 08, Figure 20).

III.7. Activité des phosphatases alcalines (PAL)

D'après nos résultats, une augmentation très hautement significative de l'activité des phosphatases alcalines est observée chez le lot NaF par rapport au témoin. Par contre le traitement des rats par l'acide gallique, le *Punica granatum* ou leur combinaison a provoqué comparativement au groupe NaF une baisse très hautement significative (Tableau 08, Figure 20).

III.8. Activité du lactate deshydrogénase (LDH)

Les résultats obtenus montrent une augmentation très hautement significative de l'activité enzymatique de LDH chez le lot NaF par rapport au témoin. Par contre on a enregistré une baisse hautement significative chez le groupe NaF+AG+PG et très hautement significative chez le groupe NaF+AG et le groupe NaF+PG par rapport au groupe NaF (Tableau 08, Figure 20).

III.9. Activité de la créatine phosphokinase (CPK)

Nos résultats indiquent une augmentation très hautement significative de l'activité enzymatique de la CPK chez le lot NaF par rapport au témoin. Ils indiquent également une baisse hautement significative chez le groupe NaF+AG et le groupe NaF+PG, et très hautement significative chez le groupe NaF+AG+PG comparativement au groupe NaF (Tableau 08, Figure 20).

Tableau 08 : Variation de l'activité enzymatique (U/l) des transaminases (ASAT, ALAT) des phosphatases alcalines (PAL), de la lactate déshydrogénase (LDH) et de la créatine phosphokinase (CPK) chez les rats témoins et les rats traités.

Paramètres	Lots expérimentaux					
	Témoin	NaF	NaF+AG	NaF+PG	NaF+AG+PG	PG
ASAT (U/l)	152,71±4,72	261,82±2,26**	173,32±6,35#	110,94±5,86##	108,9±0,83###	133,39±2,64
%		71,45	13,5	-27,35	-28,69	-12,65
%			-33,8	-57,63	-58,41	
ALAT (U/l)	162,43±3,18	281,3±1,56***	219,25±1,06**###	170,38±3,15##	171,93±3,07###	158,56±2,73
%		73,18	34,98	4,9	5,85	-2,38
%			-22,06	-39,43	-38,88	
PAL (U/l)	113,25±2,1	277,57±1,74***	87,67±0,48*###	116,64±2,35###	113,47±1,3###	101,2±2,76
%		145,09	-22,59	2,99	0,19	-10,64
%			-68,41	-57,98	-59,12	
LDH (U/l)	704,83±5,14	1118,5±5,21***	807,83±7,78**###	825,17±5,7*###	763,5±12,25##	752±10,71
%		58,69	14,61	17,07	8,32	6,69
%			-27,77	-26,22	-31,74	
CPK (U/l)	733,83±5,14	1153,5±10,62***	821,5±10,14##	855,5±5,66*##	775±7,66###	771,83±11,34
%		57,19	11,95	16,58	5,61	5,18
%			-28,78	-25,83	-32,81	

* : Différence significative par rapport au témoin ($p \leq 0,05$), ** : Différence hautement significative par rapport au témoin ($p \leq 0,01$), *** : Différence très hautement significative par rapport au témoin ($p \leq 0,001$), # : Différence significative par rapport au NaF ($p \leq 0,05$), ## : Différence hautement significative par rapport au NaF ($p \leq 0,01$), ### : Différence très hautement significative par rapport au NaF ($p \leq 0,001$).

p : Seuil de signification.

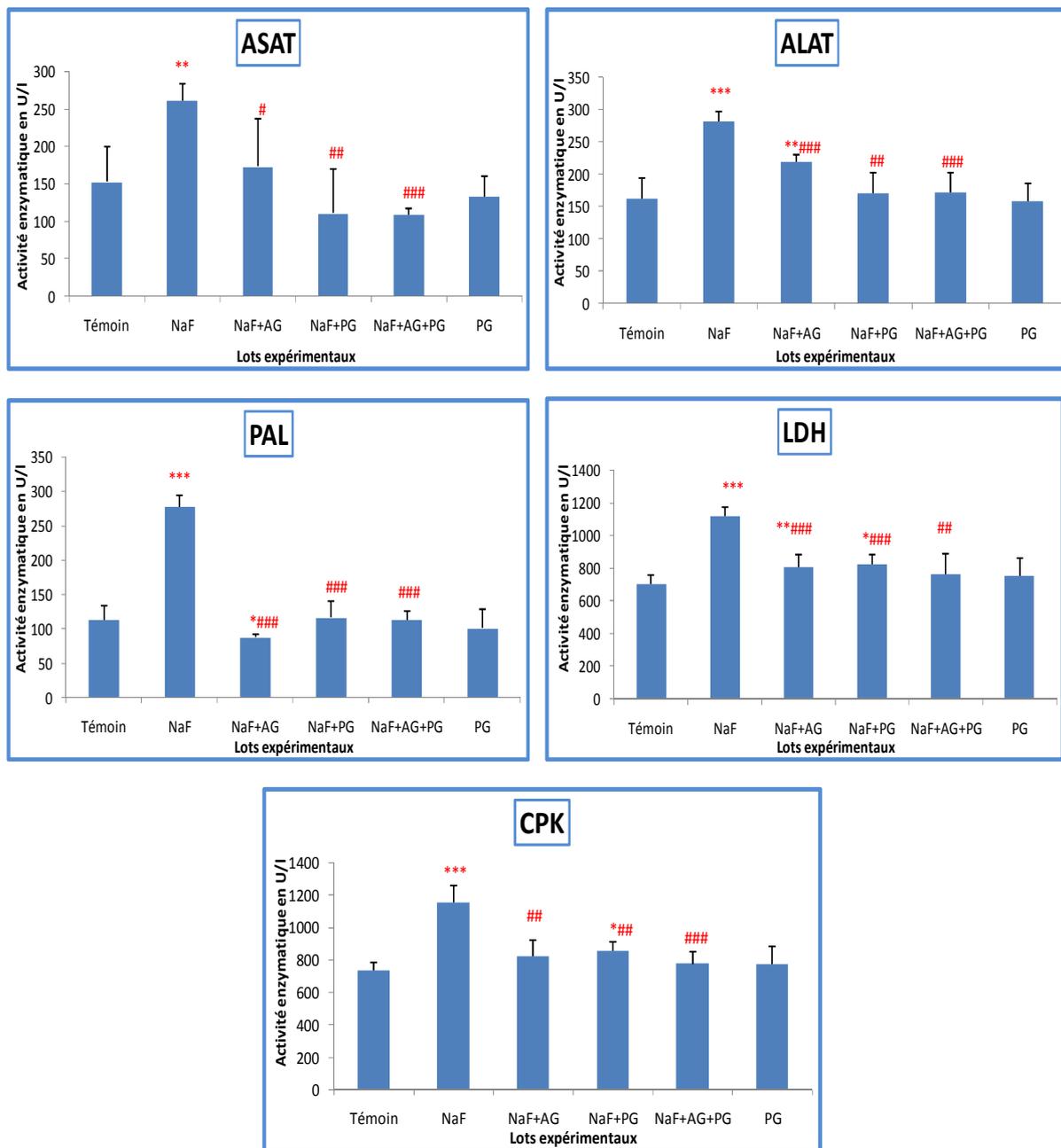


Figure 20 : Variation de l'activité enzymatique (U/l) des transaminases (ASAT, ALAT) des phosphatases alcalines (PAL), de la lactate déshydrogénase (LDH) et de la créatine phosphokinase (CPK) chez les rats témoins et les rats traités.

* : Différence significative par rapport au témoin ($p \leq 0,05$), ** : Différence hautement significative par rapport au témoin ($p \leq 0,01$), *** : Différence très hautement significative par rapport au témoin ($p \leq 0,001$), # : Différence significative par rapport au NaF ($p \leq 0,05$), ## : Différence hautement significative par rapport au NaF ($p \leq 0,01$), ### : Différence très hautement significative par rapport au NaF ($p \leq 0,001$).

p : Seuil de signification.

❖ Discussion

Au cours de notre étude, nous avons enregistré une augmentation de la glycémie chez les rats traités par le fluorure de sodium par rapport aux rats témoins. Les effets des fluorures sur le métabolisme du glucose ont été étudiés *in vitro* et *in vivo*, les résultats de ces études ont montré que l'exposition aux fluorures pourrait augmenter la glycémie et développer une intolérance au glucose (**Kanbur et al., 2009 ; Barbier et al. 2010**). Les travaux de **Menoyo et al., (2005)** sur des îlots de Langerhans isolés des rats ont permis de mettre en évidence une corrélation entre l'exposition aux fluorures et la diminution de la sécrétion de l'insuline.

La co-administration de l'acide gallique et/ou le jus de *Punica granatum* a provoqué une baisse de la glycémie, cet effet est probablement dû à une amélioration de la sécrétion de l'insuline à partir des cellules β des îlots de Langerhans et par conséquent, une augmentation de la glycolyse (**Banihani et al., 2014**). Il pourrait également être dû à une action extrapancréatique, en effet **Punithavathi et al., (2011)** ont rapporté que l'effet hypoglycémiant de l'acide gallique est dû à une diminution de la néoglucogenèse par inhibition de la glucose-6-phosphatase, ce qui diminue la production hépatique du glucose. Alors que **Patel et al., (2014)** ont trouvé que les composés phénoliques présents dans les feuilles de *Punica granatum* activent la synthèse du glycogène, diminuent l'absorption intestinale du glucose et augmentent sa capture par les tissus périphériques.

Dans la présente étude, une diminution dans le taux plasmatique de la bilirubine, de l'albumine et des protéines totales a été enregistrée chez les rats traités par le fluorure de sodium par rapport aux témoins. La baisse des protéines totales peut être due à des altérations de leur synthèse et/ou leur métabolisme (**Heidenreich et al., 1999 ; Kant et al., 2009**). Au cours des études précédentes, il a été prouvé que le traitement par le fluorure de sodium, inhibe la synthèse des protéines en altérant l'initiation de la transcription de l'ARNm codant pour la chaîne peptidique ou en bloquant sa traduction au niveau des ribosomes. L'inhibition de la synthèse des protéines peut être due également à l'inhibition de la glutamine synthétase qui catalyse certaines étapes de la biosynthèse des acides aminés (**Qujeq et al., 2002 ; Bhardwaj et Aggarwal, 2013**).

La diminution du taux de l'albumine est due donc soit à la diminution de la synthèse protéique, soit à son utilisation comme agent antioxydant (**Kanbur et al., 2009**). **Bhardwaj et Aggarwal, (2013)** ont montré que les fluorures altèrent la structure tridimensionnelle de l'albumine en formant des ponts disulfures ce qui cause une altération de sa fonction.

Ces résultats sont en accord avec ceux de **Panneerselvam et al., (2013)** ainsi qu'avec ceux de **Bouaziz et al., (2006b)**, ces derniers ont attribué cette diminution à une réaction inflammatoire, ce qui est confirmée par nos coupes histologiques.

La co-administration de l'acide gallique ou du jus de *Punica granatum* a provoqué une augmentation plasmatique des protéines totales et de l'albumine. Ceci pourrait être expliqué par une augmentation de l'anabolisme des protéines et une diminution de leur catabolisme. En effet il, est connu que certains phénols présents dans le jus de *Punica granatum* notamment la quercétine, ont une grande affinité vis à vis des protéines, donc ceci pourrait également expliqué l'activité protectrice du jus de *Punica granatum* vis à vis des protéines contre les attaques radicalaires induites par le fluorure de sodium (**Guo et al., 2008**).

La détermination de l'activité enzymatique des aminotransférases ainsi que des phosphatases est d'une grande importance de point de vue clinique et toxicologique. En effet les changements de leurs activités sont des indicateurs d'une altération tissulaire. Au cours de notre étude nous avons remarqué une augmentation de l'ASAT, de l'ALAT, de la PAL, de la LDH, et de la CPK chez les rats traités par le fluorure de sodium, ce qui reflète une atteinte du tissu hépatique expliquée par la toxicité du fluorure de sodium qui mène à la libération de ces enzymes du cytosol hépatique vers la circulation sanguine.

D'autre part l'élévation de l'activité de l'ASAT et de l'ALAT peut être également expliquée par l'accumulation des acides aminés provenant de la dégradation des composés protéiques. Ces acides aminés peuvent se transformer en composés carboxyliques ce qui implique une forte activité des transaminases.

Il a été rapporté aussi que le fluorure de sodium peut former des liaisons avec les ions magnésium (Mg) et provoquer une altération des enzymes Mg dépendante comme les phosphatases alcalines (**Mysliwiec et al., 2002**).

Aussi, il a été prouvé que l'élévation de l'activité de la LDH est due aux anions superoxydes et des radicaux hydroxyles qui endommagent les membranes cellulaires et augmentent ainsi leur perméabilité (**Kaczor et al., 2005**).

Ces résultats sont similaires à ceux de **Guo-Ving et al., (2003)** qui ont enregistré une augmentation de l'activité des transaminases chez des rats traités par le fluorure de sodium (à 50, 100 et 150 mg/kg) pendant trois mois. De même, **Shanthakumari et al., (2004)** ont enregistré une augmentation significative de l'activité de l'ASAT, l'ALAT et des PAL chez des rats traités par 25 ppm de fluorure de sodium durant huit et seize semaines. De plus, **Ghosh et al., (2008)** ont également observé que le traitement par 100 ppm de NaF provoque chez le rat, une augmentation de l'activité de ces enzymes.

En revanche, le co-traitement des rats par le jus de *Punica granatum* et/ou l'acide gallique a entraîné une atténuation de l'activité de ces enzymes. Cet effet est probablement dû à une activité cytoprotectrice vis à vis des cellules hépatique. L'effet protecteur de l'acide gallique peut être expliqué par sa capacité de prévenir la peroxydation lipidique, due à son effet scavenger vis à vis des ions superoxydes et des radicaux hydroxyles (**Jadon et al., 2007**). Ces résultats sont en accord avec ceux **Stanely Mainzen Prince et al., (2009)**, ces derniers ont montré que le traitement des rats par 15 mg/Kg de l'acide gallique diminue la peroxydation lipidique au niveau cardiaque et inhibe la libération de ces enzymes dans le sang en préservant les membranes cardiaques des ruptures.

Shafik et El-Batsh (2015) ont enregistré aussi une diminution de l'activité enzymatique de l'ASAT et de l'ALAT accompagnée d'une augmentation du taux des protéines totales et de l'albumine après un traitement par un extrait de *Punica granatum* chez des rats intoxiqués par l'Arsenic.

Chapitre IV : Impact du fluorure de sodium sur le profile lipidique et effet protecteur de la supplémentation en acide gallique et/ou le jus de *Punica granatum*.

IV.1. Concentration plasmatique en cholestérol

Nos résultats illustrent une augmentation hautement significative chez le groupe NaF par rapport au témoin. Ils montrent aussi une baisse hautement significative chez le groupe NaF+PG et le groupe NaF+AG+PG comparativement au lot NaF. La baisse enregistrée chez le lot NaF+AG par rapport au lot NaF est statistiquement très hautement significative. Une différence significative a été également enregistrée chez le groupe PG par rapport au témoin (Tableau 09, Figure 21).

IV.2. Concentration plasmatique en triglycérides

Selon nos résultats, une augmentation hautement significative est enregistrée chez le groupe NaF par rapport au témoin. Ces résultats montrent aussi une diminution significative et hautement significative chez le groupe NaF+PG et le groupe NaF+AG respectivement par rapport au groupe NaF. Une baisse hautement significative a été enregistrée chez le lot PG par rapport au témoin (Tableau 09, Figure 21).

IV.3. Concentration plasmatique en HDL-cholestérol

D'après les résultats groupés dans le tableau 09 on remarque une diminution très hautement significative chez le lot NaF par rapport aux rats témoins. Par contre l'administration de l'acide gallique ou le *Punica granatum* aux traités par le fluorure de sodium a normalisé les valeurs de L'HDL.

IV.4. Concentration plasmatique en VLDL

Nos résultats montrent une augmentation hautement significative chez le lot NaF par rapport au témoin. Ils montrent aussi une diminution significative et hautement significative chez les groupes NaF+PG et NaF+AG respectivement comparativement au groupe NaF. On a enregistré également une diminution hautement significative chez le lot PG par rapport au témoin (Tableau 09, Figure 21).

Tableau 09 : Variation de la concentration plasmatique (mg/dl) : du cholestérol, des triglycérides, de l'HDL et des VLDL chez les rats témoins et les rats traités.

Paramètres	Lots expérimentaux					
	Témoin	NaF	NaF+AG	NaF+PG	NaF+AG+PG	PG
Cholestérol (mg/dl)	93,67± 7,89	156±31,25 ^{***}	71,67± 7,03 ^{***###}	102± 24,21 ^{##}	87,67±17,21 ^{##}	83,5±7,2 [*]
%		66,54	-23,49	8,89	-6,4	-10,85
%			-54,06	-34,61	-43,8	
Triglycérides (mg/dl)	92±6,29	161,17±34,68 ^{**}	72,33±7,74 ^{***##}	100,5±24,39 [#]	119,5±26,28	53±9,19 ^{**}
%		75,18	-21,38	9,24	29,89	-42,39
%			-55,12	-37,64	-25,85	
HDL (mg/dl)	67,33±5,89	43,33±2,16 ^{***}	64,17±4,83 ^{###}	63,5±7,71 ^{##}	55,67±11,18	51,5±8,5 ^{***}
%		-35,64	-4,69	-5,69	-17,32	-23,51
%			48,1	46,55	28,48	
VLDL (mg/dl)	18,4±1,26	32,23±6,94 ^{**}	14,47±1,55 ^{***##}	20,1±4,88 [#]	23,9±5,26	10,6±1,84 ^{**}
%		75,16	-21,36	9,24	29,89	-42,39
%			-55,1	-37,63	-25,84	

* : Différence significative par rapport au témoin ($p \leq 0,05$), ** : Différence hautement significative par rapport au témoin ($p \leq 0,01$), *** : Différence très hautement significative par rapport au témoin ($p \leq 0,001$), # : Différence significative par rapport au NaF ($p \leq 0,05$), ## : Différence hautement significative par rapport au NaF ($p \leq 0,01$), ### : Différence très hautement significative par rapport au NaF ($p \leq 0,001$).

p : Seuil de signification.

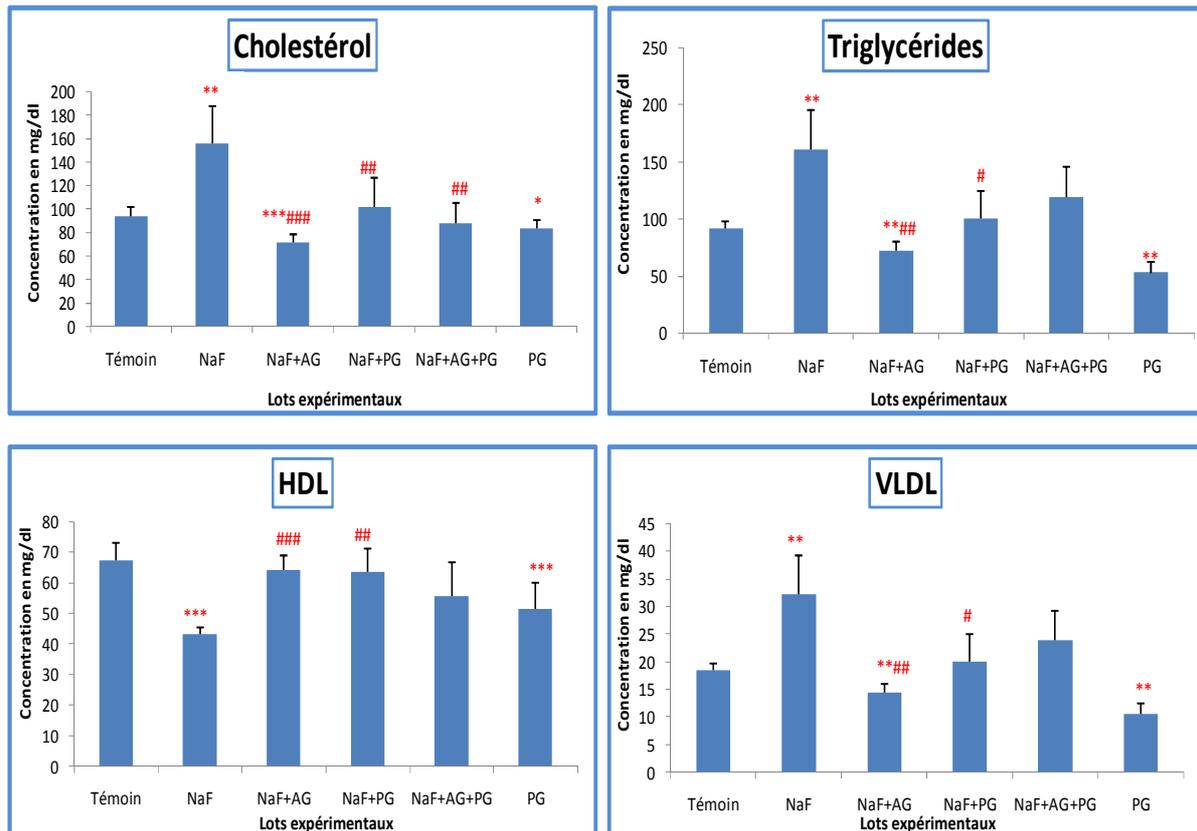


Figure 21 : Variation de la concentration plasmatique (mg/dl) : du cholestérol, des triglycérides, de l'HDL et des VLDL chez les rats témoins et les rats traités.

* : Différence significative par rapport au témoin ($p \leq 0,05$), ** : Différence hautement significative par rapport au témoin ($p \leq 0,01$), *** : Différence très hautement significative par rapport au témoin ($p \leq 0,001$), # : Différence significative par rapport au NaF ($p \leq 0,05$), ## : Différence hautement significative par rapport au NaF ($p \leq 0,01$), ### : Différence très hautement significative par rapport au NaF ($p \leq 0,001$)

p : Seuil de signification.

❖ Discussion

Nos résultats montrent aussi que l'exposition au NaF provoque une augmentation du taux plasmatique du cholestérol, des triglycérides et des VLDL accompagnée d'une diminution de celui de l' HDL.

L'hypertriglycéridémie observée est essentiellement liée à une augmentation de la concentration des VLDL. Cet accroissement du pool des lipoprotéines riches en triglycérides s'explique d'une part par une augmentation de la production hépatique des VLDL et d'autre part par un ralentissement de leur catabolisme (**Hassan et Youcef, 2009**).

L'hypercholestérolémie enregistrée est également liée à l'augmentation de la synthèse des VLDL ainsi qu'à celle du cholestérol induite par un dysfonctionnement hépatique ou par une insulino-résistance. Les changements des taux des triglycérides et du cholestérol peuvent être aussi le résultat d'une altération de l'activité de certaines enzymes notamment la triglycéride lipase et la pyrophosphatase (**Mysliwiec et al., 2002**). **Shabir (2013)** et ces collaborateurs ont attribué l'augmentation du taux des triglycérides et du cholestérol observée au cours d'un stress oxydant à une hyperactivité hypothalamo-hypophysaire qui cause une augmentation de la libération des catécholamines et des corticostéroïdes activant la lipolyse dans les adipocytes et la libération des acides gras et par conséquent une augmentation de la synthèse hépatique des triglycérides.

Nos résultats sont similaires à ceux de **Panneerselvam et al. (2013)** qui ont trouvé que le traitement oral des rats par 12 mg/l de fluorure de sodium durant douze semaines cause une augmentation remarquable de la concentration plasmatique du cholestérol, des triglycérides ainsi que des VLDL.

L'administration de l'acide gallique et/ou le jus de *Punica granatum* a baissé significativement la cholestérolémie, la triglycéridémie ainsi que le taux des VLDL. Cette baisse a été accompagnée d'une augmentation de la concentration des HDL. Ces résultats sont en accord avec ceux de **Esmail et al., (2006)**, ces derniers ont prouvé que la consommation du jus de *Punica granatum* permet la régulation de l'hyperlipidémie enregistrée chez des patients diabétiques.

Cette action peut être due d'après des études récentes aux polyphénols et ellagitanins qui peuvent agir comme inhibiteurs de certaines enzymes tels que les lipases et l'hydroxyméthyl glutaryl CoA réductase. En effet, **Zhen et al., (2005)** ont montré *in vitro* que les tanins contenus dans les feuilles de *Punica granatum* ont un effet sur cette enzyme. De plus, **Parmar et kar, (2007)** ont attribué l'effet hypolipémiant de l'écorce du grenadier aux polyphénols. **Dingge et al. (1999)** ont montré que les feuilles de *Punica granatum* ont également un effet régulateur sur le profile lipidique. Alors que **Bagri et al., (2009)** ont montré que les fleurs de cette espèce ont un effet hypolipémiant chez des rats traité par la streptozotocine. L'efficacité de l'acide gallique dans la régulation du profil lipidique durant un stress oxydant a été également bien prouvé (**Shabir et al., 2013**).

Chapitre V : Impact du fluorure de sodium sur la fonction rénale et effet protecteur de la supplémentation en acide gallique et/ou le jus de *Punica granatum*.

V.1. Concentration plasmatique en urée

Les résultats rassemblés dans le tableau 10 montrent une augmentation très hautement significative chez le lot NaF par rapport au témoin. Ils montrent aussi une diminution significative, hautement significative et très hautement significative chez le groupe NaF+AG, NaF+PG et NaF+AG+PG respectivement et comparativement au groupe NaF.

V.2. Concentration plasmatique en créatinine

Les résultats obtenus montrent une augmentation significative des valeurs de la créatinine chez le groupe NaF par rapport au témoin. Par contre le traitement des rats par le NaF plus l'acide gallique et/ou le *Punica granatum* a normalisé ces valeurs (Tableau 10, Figure 22).

V.3. Concentration plasmatique en acide urique

Nos résultats illustrent une augmentation hautement significative de l'acide urique chez le lot NaF comparativement au témoin. Le traitement des rats par le NaF plus l'acide gallique, le *Punica granatum* ou leur combinaison a normalisé ces taux (Tableau 10, Figure 22).

Tableau 10: Variation de la concentration plasmatique (en mg/dl) de : l'urée, la créatinine et de l'acide urique chez les rats témoins et les rats traités.

Paramètres	Lots expérimentaux					
	Témoin	NaF	NaF+AG	NaF+PG	NaF+AG+PG	PG
Urée (mg/dl)	22,55±3,25	56±9,82 ^{***}	36,33±9,82 ^{***#}	33,17±5,42 ^{*##}	27±3,58 ^{###}	35,08±6,57 ^{***}
%		148,34	61,09	47,09	19,73	55,56
%			-35,12	-40,77	-51,79	
Créatinine (mg/dl)	37,33±11,45	50,17±4,62 [*]	31,83±2,32 ^{##}	41±4,94 [#]	36,83±4,4 ^{##}	31,67±5,75
%		34,4	-14,73	9,83	-1,34	-15,16
%			-36,55	-18,28	-26,59	
Acide urique (mg/dl)	14,33±3,93	23,5±3,62 ^{**}	10,5±4,6 ^{##}	11,33±4,41 ^{##}	15,5±3,67 [#]	22,5±4,84 [*]
%		63,99	-26,73	-20,93	8,16	57,01
%			-55,32	-51,79	-34,04	

* : Différence significative par rapport au témoin ($p \leq 0,05$), ** : Différence hautement significative par rapport au témoin ($p \leq 0,01$), *** : Différence très hautement significative par rapport au témoin ($p \leq 0,001$), # : Différence significative par rapport au NaF ($p \leq 0,05$), ## : Différence hautement significative par rapport au NaF ($p \leq 0,01$), ### : Différence très hautement significative par rapport au NaF ($p \leq 0,001$).

p : Seuil de signification.

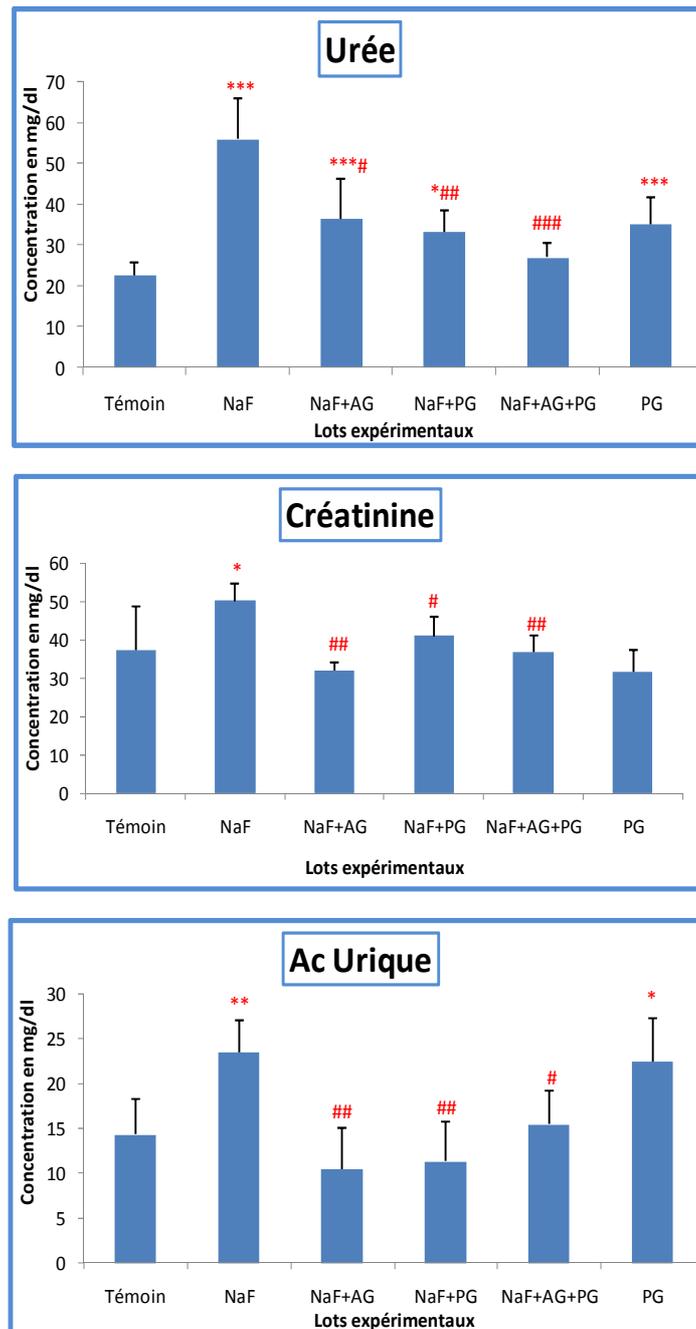


Figure 22 : Variation de la concentration plasmatique (en mg/dl) de : l'urée, la créatinine et de l'acide urique chez les rats témoins et les rats traités.

* : Différence significative par rapport au témoin ($p \leq 0,05$), ** : Différence hautement significative par rapport au témoin ($p \leq 0,01$), *** : Différence très hautement significative par rapport au témoin ($p \leq 0,001$), # : Différence significative par rapport au NaF ($p \leq 0,05$), ## : Différence hautement significative par rapport au NaF ($p \leq 0,01$), ### : Différence très hautement significative par rapport au NaF ($p \leq 0,001$).

p : Seuil de signification.

❖ Discussion

Les résultats obtenus révèlent que le traitement par le fluorure de sodium engendre un dysfonctionnement rénal caractérisé par une augmentation claire de la concentration plasmatique de l'urée, de la créatinine ainsi que de l'acide urique. Cette augmentation est expliquée par la dégradation des protéines totales en acides aminés puis en urée et en créatinine, ceci est confirmé par la diminution du taux des protéines totales dans le plasma enregistrée au cours de cette étude.

De plus la glycation des protéines peut augmenter la libération des purines, principales sources de l'acide urique, ce qui explique l'élévation de sa teneur plasmatique. Ainsi, **Bouaziz et al., (2007)** ont aussi enregistré une augmentation de la concentration de l'acide urique chez des souris traitées par 500 ppm de fluorure de sodium pendant un mois. Des effets similaires sont observés chez des enfants atteints d'une fluorose (**Shivarajashankara et al., 2001**).

On note que le taux plasmatique en urée, en créatinine et en acide urique diminue après traitement par l'acide gallique. De même, l'augmentation de ces paramètres causée par le fluorure de sodium a été déclinée après un co-traitement par le jus de *Punica granatum*. Cet effet est probablement lié à l'amélioration du métabolisme protéique d'une part, il pourrait être du aux propriétés antioxydantes du jus de *Punica granatum* et de l'acide gallique qui exercent des effets protecteurs sur les cellules rénales, d'autre part, ce qui est confirmé par l'étude histologique.

Le pouvoir protecteur du fruit de *Punica granatum* contre la néphrotoxicité induite par des agents chimiques a été décrit par d'autres groupes de chercheurs (**Rathod et al., 2012**). Des données antérieures indiquent aussi que l'administration de 50 mg/kg l'acide gallique pendant trente jours, baisse significativement le taux de la créatinine et de l'urée chez des rats traités par le lindane **Vijaya Padma et al., (2011)**.

Chapitre VI : Impact du fluorure de sodium sur la concentration des hormones thyroïdiennes et de la testostérone et effet protecteur de la supplémentation en acide gallique et/ou le jus de *Punica granatum*.

VI.1. Concentration sérique en triiodothyronine (T₃)

Les résultats rassemblés dans le tableau 11 montrent une baisse hautement significative chez le groupe NaF par rapport au témoin. Ils montrent aussi que le traitement des rats par l'acide gallique et/ou le *Punica granatum* a normalisé le taux de la T₃.

VI.2. Concentration sérique en thyroxine (T₄)

Les résultats obtenus indiquent une diminution statistiquement significative chez le lot NaF comparativement au lot témoin. Ces résultats indiquent également que le traitement par l'acide gallique, le *Punica granatum* ou leur combinaison a normalisé ces valeurs (Tableau 11, Figure 23).

VI.3. Concentration sérique en Testostérone

Nos résultats illustrent par rapport au témoin une baisse significative et hautement significative chez le groupe NaF+AG et le groupe NaF respectivement. Par contre on enregistré chez le groupe NaF+PG une augmentation statistiquement significative par rapport au groupe NaF (Tableau 11, Figure 23).

Tableau 11 : Variation de la concentration plasmatique de la concentration sérique (ng/ml) de la T₃, T₄ et de la testostérone chez les rats témoins et les rats traités.

Paramètres	Lots expérimentaux					
	Témoin	NaF	NaF+AG	NaF+PG	NaF+AG+PG	PG
T ₃ (ng/ml)	3,53±0,23	2,99±0,15**	3,31±0,29 [#]	3,46±0,26 ^{##}	3,56±0,25 ^{##}	3,56±0,24
%		-15,3	-6,23	-1,98	0,84	0,84
%			10,7	15,71	19,06	
T ₄ (ng/ml)	2,31±0,26	1,86±0,21*	2,11±0,41	2,08±0,44	2,54±0,45	2,52±0,25
%		-19,48	-8,66	-9,96	9,96	9,09
%			13,44	11,83	36,56	
Testostérone (ng/ml)	2,22±0,44	1,38±0,22**	1,66±0,25*	2,05±0,6 [#]	2,03±0,89	1,86±0,78
%		-37,84	-25,22	-7,66	-8,56	-16,21
%			20,29	48,55	47,1	

* : Différence significative par rapport au témoin ($p \leq 0,05$), ** : Différence hautement significative par rapport au témoin ($p \leq 0,01$), # : Différence significative par rapport au NaF ($p \leq 0,05$), ## : Différence hautement significative par rapport au NaF ($p \leq 0,01$).

p : Seuil de signification.

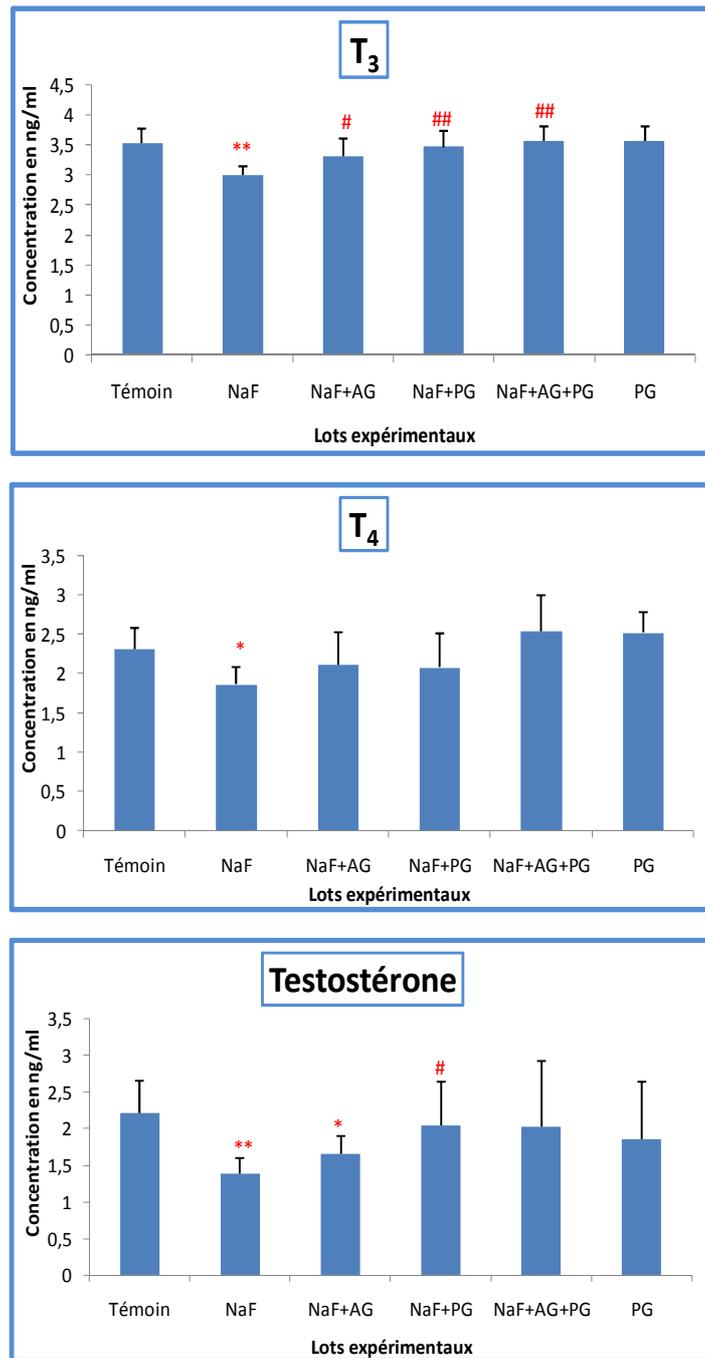


Figure 23 : Variation de la concentration sérique (ng/ml) de la triiodothyronine, la thyroxine et de la testostérone chez les rats témoins et les rats traités.

* : Différence significative par rapport au témoin ($p \leq 0,05$), ** : Différence hautement significative par rapport au témoin ($p \leq 0,01$), # : Différence significative par rapport au NaF ($p \leq 0,05$), ## : Différence hautement significative par rapport au NaF ($p \leq 0,01$).

p : Seuil de signification.

❖ Discussion

Le dosage hormonal a révélé une diminution de la concentration de la T₃, T₄ ainsi que celle de la testostérone chez les rats traités par le fluorure de sodium par rapport aux témoins. La baisse des hormones thyroïdiennes est le résultat d'une perturbation de la synthèse et/ou de la sécrétion de ces hormones par la glande thyroïde. Cette perturbation peut être due à un dysfonctionnement thyroïdien causé par des lésions cellulaires suite à l'accumulation des radicaux libre générés par le fluorure de sodium au niveau de cette glande.

Ghosh et al., (2002) ont enregistré une diminution de la concentration de la testostérone après un traitement oral quotidien des rats par 20 mg/kg de NaF. Cet effet peut être expliqué par les dommages oxydatifs induit par le NaF au niveau des testicules.

L'administration de l'acide gallique et/ou le jus de *Punica granatum* a presque normalisé le taux de ces hormones, ceci est probablement du à l'effet antioxydant de l'acide gallique ainsi que du jus de *Punica granatum*. **Al-Olayan et al., (2014)** ont enregistré des observations similaires au cours d'une étude réalisée sur des rats intoxiqués par le tetrachloride de carbone (CCl₄). Les résultats de cette étude indiquent que le traitement par le jus de *Punica granatum* a augmenté les concentrations de la testostérone, de la LH (Luteinizing Hormone) et de la FSH (Fillicule Stimulating Hormone). Ils ont expliqué cet effet par la capacité des tanins et des flavonoïdes présents dans ce jus de réduire les dommages oxydatifs notamment au niveau des cellules de Leydig.

Tandis que, **Turk et al., (2008)** ont montré que la consommation quotidienne du jus de la grenade pendant sept semaines provoque une augmentation de : la densité des cellules spermatogéniques, la concentration du sperme epididymale, elle améliore aussi la qualité du sperme.

Elle provoque également une diminution de la peroxydation lipidique testiculaire. Ces effets sont essentiellement dus aux composés antioxydant présents dans ce jus notamment les anthocyanines, les tanins hydrolysables : punicalagine et punicaline, l'acide gallique, l'acide ellagique et la vitamine C.

Parmar et kar, (2007) ont également montré que le traitement par un extrait méthanolique de l'écorce de *Punica granatum* provoque une augmentation des T₃ et T₄ chez des rats présentant un dysfonctionnement thyroïdien.

Chapitre VII : Stress oxydant induit par le fluorure de sodium et effet protecteur de la supplémentation en acide gallique et/ou le jus de *Punica granatum*.

VII.1. Effet sur le taux du glutathion réduit (GSH)

Les résultats obtenus et groupés dans le tableau 12 montrent comparativement aux rats témoins, une baisse très hautement significative du taux du GSH chez les rats du lot NaF. Cette diminution est enregistrée dans les globules rouges et dans tous les organes étudiés (foie, reins, cœur, testicules). Le traitement des rats par le NaF plus l'acide gallique a provoqué comparativement aux rats traités par le NaF uniquement, une augmentation hautement significative et très hautement significative au niveau du foie et des reins respectivement. Au niveau du cœur et des testicules, ce traitement (NaF+AG) a normalisé les valeurs du GSH.

Nos résultats indiquent aussi que le traitement par le NaF plus le *Punica granatum* a normalisé ces valeurs au niveau des reins et du cœur. De plus, il a provoqué au niveau des testicules, une augmentation hautement significative par rapport au témoin.

Le traitement des rats par la combinaison NaF, acide gallique et *Punica granatum* a normalisé le taux du GSH au niveau du foie et du cœur. Au niveau des testicules, il a provoqué une augmentation significative comparativement au témoin (Figure 24).

VII.2. Effet sur le taux du malaondialdéhyde (MDA)

Nos résultats rassemblés dans le tableau 13 indiquent une augmentation très hautement significative de la concentration de l'MDA chez le lot NaF par rapport au lot témoin (au niveau des globules rouges ainsi que tous les organes étudiés).

Ces résultats montrent que le traitement des rats par le NaF plus l'acide gallique a provoqué comparativement aux rats traités uniquement par le fluorure de sodium une baisse très hautement significative au niveau du foie, des reins et des globules rouges.

Alors que le traitement par le fluorure de sodium plus le jus de *Punica granatum* a provoqué par rapport aux rats traités uniquement par le NaF, une diminution très hautement significative au niveau du foie et des globules rouges (Figure 25).

Tandis que la co-administration du NaF, AG et le PG a provoqué une baisse significative au niveau des reins par rapport au lot NaF.

Tableau 12 : Variation de la teneur en glutathion réduit (GSH) (nmol/mg protéines) dans : le foie, les reins, le cœur, les testicules et les globules rouges (GR) chez les rats témoins et les rats traités.

Paramètre	Organes	Lots expérimentaux					
		Témoin	NaF	NaF+AG	NaF+PG	NaF+AG+PG	PG
GSH (nmol / mg protéines)	foie	87,83±5,6	22,01±2,24 ^{***}	63,11±9,92 ^{***##}	48,99±8,07 ^{***###}	77,77±27,3 ^{##}	111,8±20,3 [*]
	%		-74,94	-28,14	-44,22	-11,45	27,29
	%			186,73	122,58	253,33	
	Reins	50,17±1,14	17,96±3,15 ^{***}	64,93±7,21 ^{***##}	47,34±3,42 ^{###}	42,24±4,15 ^{***##}	56,73±2,18 ^{***}
	%		-64,20	29,42	-5,64	-15,81	13,07
	%			261,53	163,59	135,19	
	Cœur	53,42±3,43	23,85±1,6 ^{***}	60,61±10,19 ^{##}	49,12±12,74 ^{##}	52,22±11,91 ^{##}	54,62±5,66
	%		-55,35	13,46	-8,05	-2,25	2,25
	%			154,13	105,95	118,95	
	Testicule	82,98±7,21	29,37±5,54 ^{***}	122,35±43,03 ^{##}	128,11±19,17 ^{***###}	130,83±33,45 ^{##}	161,77±28,61 ^{***}
	%		-64,61	47,44	54,39	57,66	94,95
	%			316,58	336,19	345,45	
	Globules Rouges	24,78±0,52	10,88±1,15 ^{***}	15,65±0,41 ^{***###}	11,37±0,33 ^{***}	15,23±0,7 ^{***###}	23,07±0,67 ^{**}
	%		-56,09	-36,84	-54,12	-38,54	-6,9
	%			43,84	4,5	39,98	

* : Différence significative par rapport au témoin (p<0,05), ** : Différence hautement significative par rapport au témoin (p<0,01), *** : Différence très hautement significative par rapport au témoin (p<0,001), ## : Différence hautement significative par rapport au NaF (p<0,01), ### : Différence très hautement significative par rapport au NaF (p<0,001).
p : Seuil de signification.

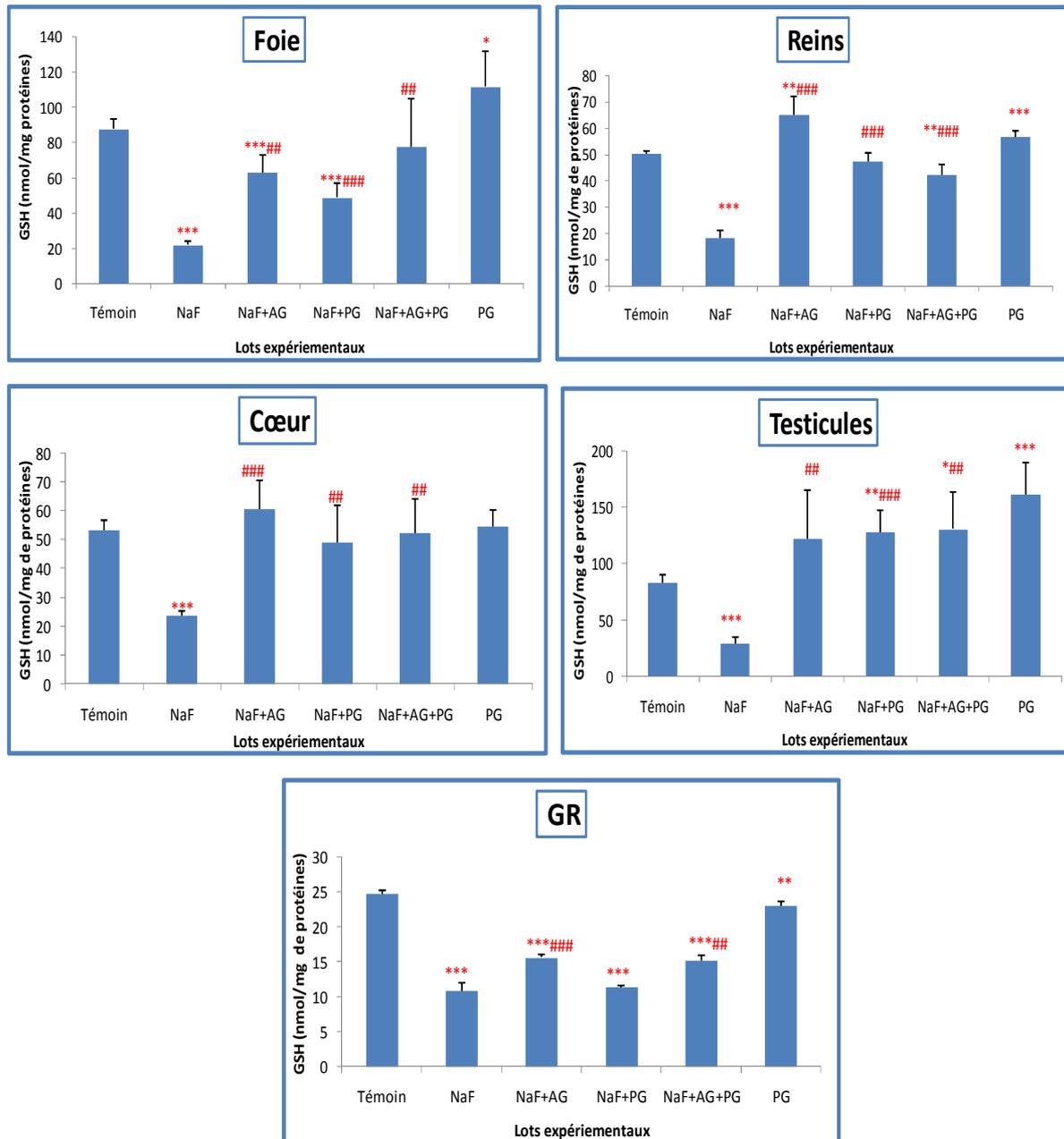


Figure 24 : Variation de la teneur en GSH (nmol/mg protéines) dans : le foie, les reins, le cœur, les testicules et les globules rouges (GR) chez les rats témoins et les rats traités.

* : Différence significative par rapport au témoin ($p \leq 0,05$), ** : Différence hautement significative par rapport au témoin ($p \leq 0,01$), *** : Différence très hautement significative par rapport au témoin ($p \leq 0,001$), ## : Différence hautement significative par rapport au NaF ($p \leq 0,01$), ### : Différence très hautement significative par rapport au NaF ($p \leq 0,001$), p : Seuil de signification.

Tableau 13 : Variation de la teneur en malaondialdehyde (MDA) (nmol/mg protéines) dans : le foie, les reins, le cœur, les testicules et les globules rouge (GR) chez les rats témoins et les rats traités.

Paramètre	Organes	Lots expérimentaux					
		Témoin	NaF	NaF+AG	NaF+PG	NaF+AG+PG	PG
MDA (nmol / mg protéines)	foie	0,27±0,01	0,56±0,01 ^{***}	0,35±0,06 ^{*###}	0,41±0,01 ^{***###}	0,43±0,06 ^{**}	0,28±0,04
	%		107,41	29,63	51,85	59,26	3,7
	%			-37,5	-26,79	-23,21	
	Reins	0,31±0,01	0,44±0,02 ^{***}	0,35±0,04 ^{*###}	0,44±0,02 ^{***}	0,41±0,03 ^{***#}	0,3±0,01
	%		41,93	12,9	41,93	32,26	-3,23
	%			-20,45	0	-6,82	
	Cœur	0,34±0,01	0,55±0,06 ^{***}	0,52±0,04 ^{***}	0,45±0,09 ^{*###}	0,51±0,14 [*]	0,39±0,03 ^{**}
	%		61,76	52,94	32,35	50	14,71
	%			-5,45	-18,18	-7,27	
	Testicule	0,84±0,07	1,42±0,13 ^{***}	1,2±0,43	1,16±0,17 ^{*###}	1,14±0,37	0,99±0,11
	%		69,05	42,86	38,09	35,71	17,86
	%			-15,49	-18,31	-19,72	
	Globules Rouges	0,32±0,02	0,49±0,02 ^{***}	0,33±0,03 ^{###}	0,38±0,03 ^{*###}	0,31±0,02	0,31±0,02
	%		53,12	3,12	18,75	-3,12	-3,12
	%			-32,65	-22,45	-36,73	

* : Différence significative par rapport au témoin ($p \leq 0,05$), ** : Différence hautement significative par rapport au témoin ($p \leq 0,01$), *** : Différence très hautement significative par rapport au témoin ($p \leq 0,001$), # : Différence significative par rapport au NaF ($p \leq 0,05$), ## : Différence hautement significative par rapport au NaF ($p \leq 0,01$), ### : Différence très hautement significative par rapport au NaF ($p \leq 0,001$).

p : Seuil de signification.

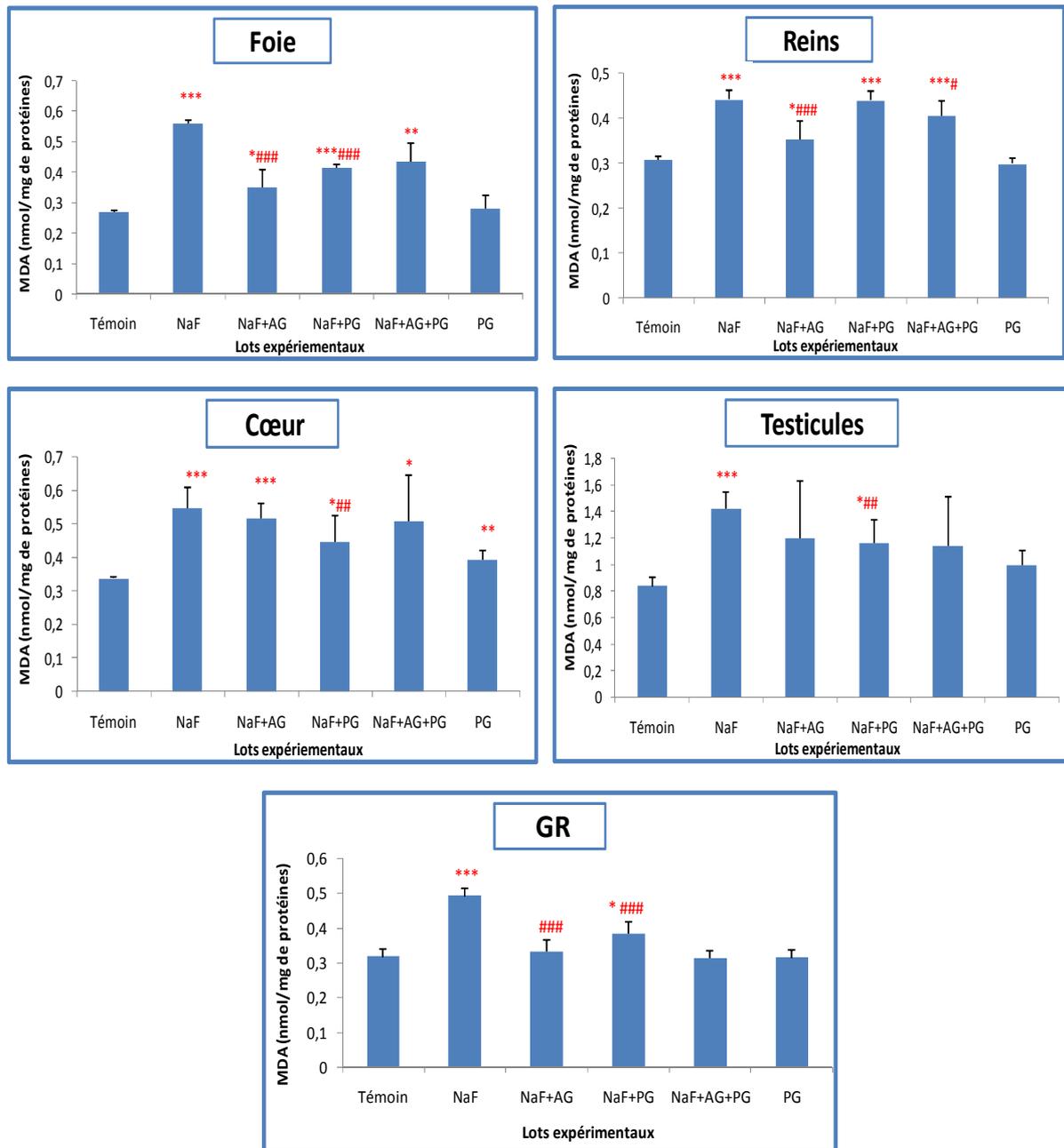


Figure 25 : Variation de la teneur en malaondialdéhyde (MDA) (nmol/mg protéines) dans : le foie, les reins, le cœur, les testicules et les globules rouges (GR) chez les rats témoins et les rats traités.

* : Différence significative par rapport au témoin ($p \leq 0,05$), ** : Différence hautement significative par rapport au témoin ($p \leq 0,01$), *** : Différence très hautement significative par rapport au témoin ($p \leq 0,001$), # : Différence significative par rapport au NaF ($p \leq 0,05$), ## : Différence hautement significative par rapport au NaF ($p \leq 0,01$), ### : Différence très hautement significative par rapport au NaF ($p \leq 0,001$),

p : Seuil de signification.

VII.3. Effet sur l'activité de la glutathion peroxydase (GPx)

Selon nos résultats, une diminution très hautement significative est enregistrée dans les globules rouges ainsi que dans tous les organes étudiés, chez le groupe NaF par rapport au témoin.

L'administration du NaF plus l'acide gallique a provoquée par rapport aux rats traités par le NaF, une augmentation significative au niveau des globules rouges et très hautement significative au niveau du foie, des reins, du cœur et des testicules.

Alors que le traitement par le NaF plus le jus de *Punica granatum* a augmenté significativement l'activité enzymatique de la GPx dans tous les organes comparativement au traitement par le fluorure de sodium uniquement (Tableau 14, Figure 26).

La combinaison entre le fluorure de sodium et l'acide gallique plus le jus de *Punica granatum* a amélioré cette activité significativement dans les globules rouges et les reins, et très hautement significativement au niveau du foie, du cœur et des testicules.

VII.4. Effet sur l'activité de la Catalase (CAT)

L'étude de l'activité enzymatique de la catalase a montré une diminution très hautement significative chez le groupe NaF comparativement au témoin.

Le traitement des rats par le NaF plus l'acide gallique a normalisé l'activité enzymatique de la catalase au niveau des globules rouges, du foie, du cœur et des testicules. Au niveau rénal, ce traitement a provoqué une augmentation très hautement significative par rapport au lot traité par le NaF uniquement.

Tandis que l'administration du fluorure de sodium plus le jus de *Punica granatum* a normalisé cette activité au niveau hépatique et testiculaire, alors qu'elle a provoqué une amélioration hautement significative au niveau cardiaque et très hautement significative au niveau rénal et érythrocytaire comparativement au groupe NaF.

Le co-traitement par le NaF et l'acide gallique plus le *Punica granatum* a également normalisé l'activité de la catalase au niveau du foie et des testicules, tandis qu'il a provoqué une augmentation très hautement significative au niveau des reins, du cœur et des globules rouges par rapport au groupe NaF (Tableau 15, Figure 27).

Tableau 14 : Variation de l'activité enzymatique de la glutathion peroxydase (GPx) (nmol GSH/min/ mg protéines) dans : le foie, les reins, le cœur, les testicules et les globules rouges (GR) chez les rats témoins et les rats traités.

Paramètre	Organes	Lots expérimentaux					
		Témoin	NaF	NaF+AG	NaF+PG	NaF+AG+PG	PG
GPx (n mol GSH / min/ mg protéines)	foie	0,17±0,005	0,07±0,002 ^{***}	0,13±0,003 ^{####}	0,1±0,01 ^{####}	0,13±0,002 ^{####}	0,15±0,002 ^{***}
	%		-58,82	-23,53	-41,18	-23,53	-11,76
	%			85,71	42,86	85,71	
	Reins	0,15±0,002	0,09±0,01 ^{***}	0,13±0,002 ^{####}	0,11±0,01 ^{####}	0,11±0,01 ^{####}	0,12±0,002 ^{***}
	%		-40	-13,33	-26,66	-26,66	-20
	%			44,44	22,22	22,22	
	Cœur	0,12±0,004	0,09±0,002 ^{***}	0,13±0,003 ^{####}	0,11±0,003 ^{####}	0,12±0,003 ^{####}	0,12±0,003 ^{**}
	%		-25	8,33	-8,33	0	0
	%			44,44	22,22	33,33	
	Testicule	0,17±0,01	0,1±0,01 ^{***}	0,26±0,004 ^{####}	0,27±0,001 ^{####}	0,27±0,004 ^{####}	0,28±0,002 ^{***}
	%		-41,18	52,49	58,82	58,82	64,71
	%			160	170	170	
	Globules Rouges	0,19±0,01	0,15±0,01 ^{***}	0,18±0,02 [#]	0,17±0,01 [#]	0,19±0,02 [#]	0,22±0,02 [*]
	%		-21,05	-5,26	-10,53	0	15,79
	%			20	13,33	26,66	

* : Différence significative par rapport au témoin ($p \leq 0,05$), ** : Différence hautement significative par rapport au témoin ($p \leq 0,01$), *** : Différence très hautement significative par rapport au témoin ($p \leq 0,001$), # : Différence significative par rapport au NaF ($p \leq 0,05$), ## : Différence hautement significative par rapport au NaF ($p \leq 0,01$), ### : Différence très hautement significative par rapport au NaF ($p \leq 0,001$).

p : Seuil de signification

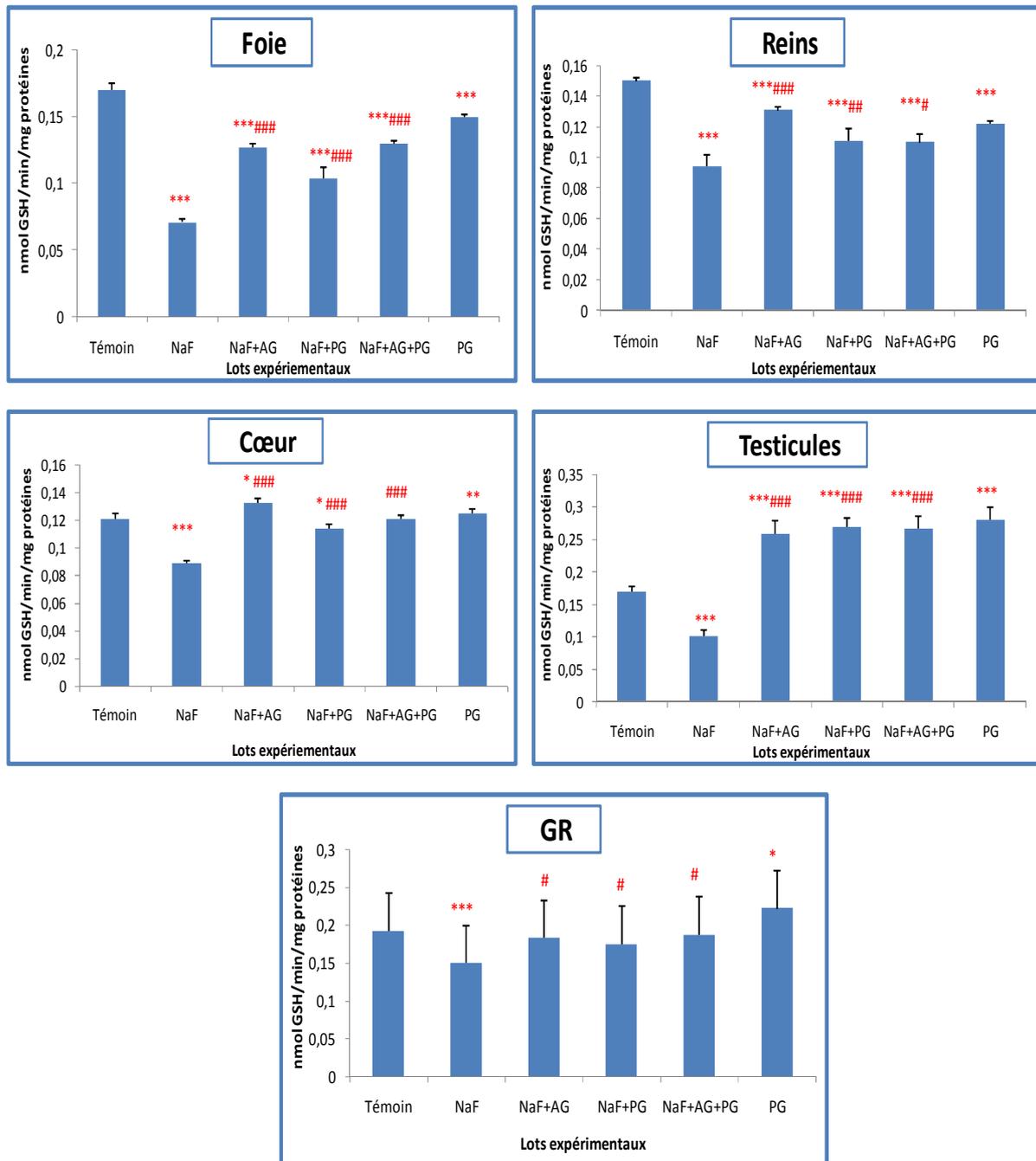


Figure 26 : Variation de l'activité enzymatique de la glutathion peroxydase (GPx) (nmol GSH/min/mg protéines) dans : le foie, les reins, le cœur, les testicules et les globules rouges (GR) chez les rats témoins et les rats traités.

* : Différence significative par rapport au témoin ($p \leq 0,05$), ** : Différence hautement significative par rapport au témoin ($p \leq 0,01$), *** : Différence très hautement significative par rapport au témoin ($p \leq 0,001$), # : Différence significative par rapport au NaF ($p \leq 0,05$), ## : Différence hautement significative par rapport au NaF ($p \leq 0,01$), ### : Différence très hautement significative par rapport au NaF ($p \leq 0,001$),

p : Seuil de signification.

Tableau 15 : Variation de l'activité enzymatique de la catalase (CAT) ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ dégradé/min/mg de protéines) dans : le foie, les reins, le cœur, les testicules et les globules rouges (GR) chez les rats témoins et les rats traités.

Paramètre	Organes	Lots expérimentaux					
		Témoin	NaF	NaF+AG	NaF+PG	NaF+AG+PG	PG
CAT ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ dégradé/min/mg de protéines)	foie	7,05±0,09	5,73±0,13***	7,4±0,36###	7±0,21###	7,37±0,35###	7,19±0,39
	%		-18,72	4,96	-0,71	4,54	1,99
	%			29,14	22,16	28,62	
	Reins	5,05±0,08	3,92±0,11***	4,65±0,15**###	4,79±0,14**###	4,57±0,1***###	5,09±0,08
	%		-22,38	-7,92	-5,15	-9,5	0,79
	%			18,62	22,19	16,58	
	Cœur	4,84±0,07	4,06±0,09***	4,85±0,11###	4,43±0,12**###	4,8±0,1***###	5±0,13*
	%		-16,11	0,11	-8,47	-0,82	3,31
	%			19,46	9,11	18,23	
	Testicule	6,54±0,03	5,45±0,09***	6,52±0,23###	6,58±0,21###	6,59±0,22###	6,42±0,14
	%		-19,67	-0,3	0,61	0,76	-1,83
	%			19,63	20,73	20,92	
	Globules Rouges	1,86±1	1,48±0,03***	1,76±0,1###	1,59±0,02**###	1,77±0,04***###	1,79±0,06
	%		-20,43	-5,52	-14,52	-4,84	-3,76
	%			18,92	7,43	19,59	

* : Différence significative par rapport au témoin ($p \leq 0,05$), ** : Différence hautement significative par rapport au témoin ($p \leq 0,01$), *** : Différence très hautement significative par rapport au témoin ($p \leq 0,001$), ## : Différence hautement significative par rapport au NaF ($p \leq 0,01$), ### : Différence très hautement significative par rapport au NaF ($p \leq 0,001$).

p : Seuil de signification.

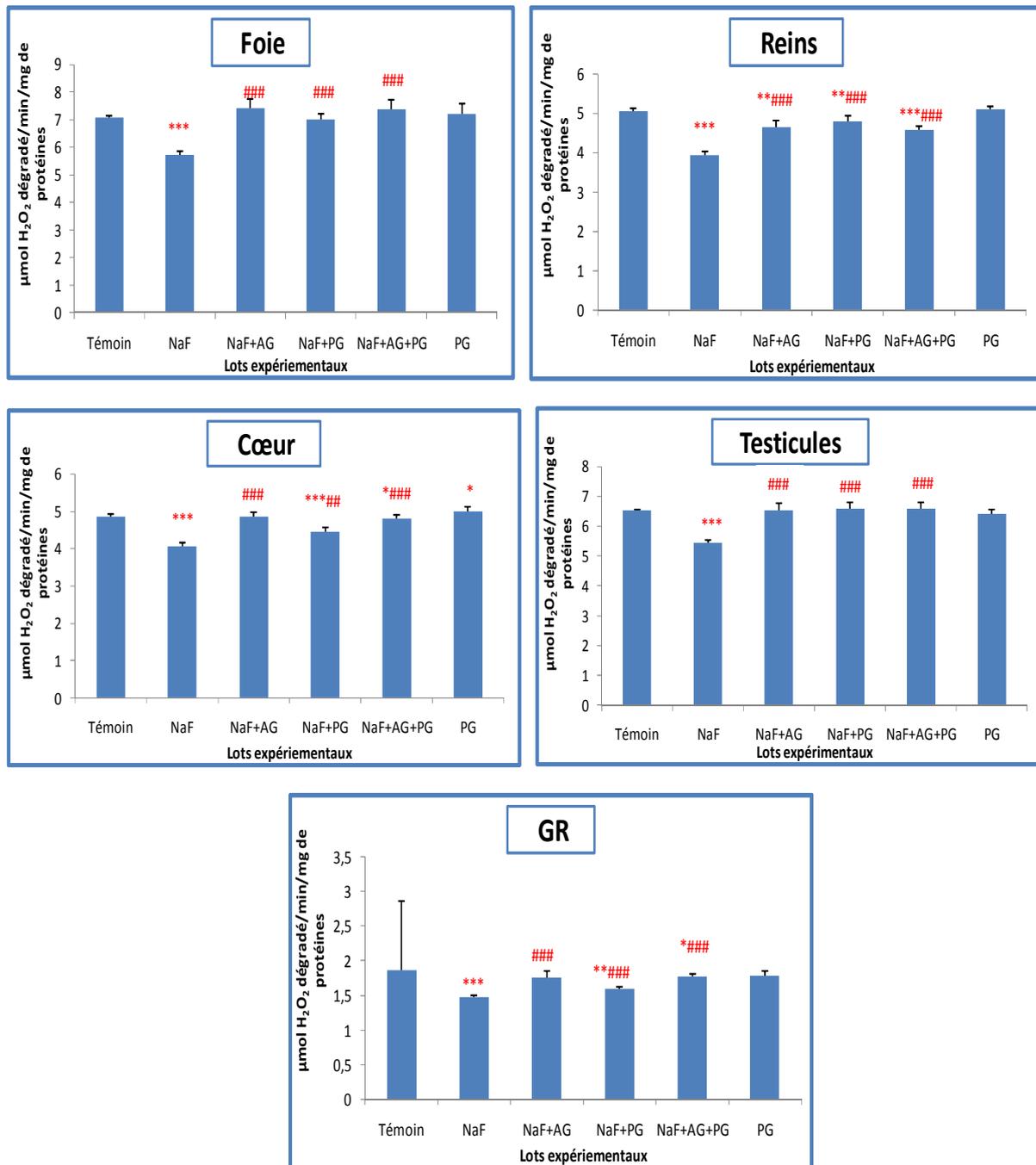


Figure 27: Variation de l'activité enzymatique de la catalase (CAT) ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ dégradé/min/mg de protéines) dans : le foie, les reins, le cœur, les testicules et les globules rouges (GR) chez les rats témoins et les rats traités.

* : Différence significative par rapport au témoin ($p \leq 0,05$), ** : Différence hautement significative par rapport au témoin ($p \leq 0,01$), *** : Différence très hautement significative par rapport au témoin ($p \leq 0,001$), ### : Différence hautement significative par rapport au NaF ($p \leq 0,01$), ### : Différence très hautement significative par rapport au NaF ($p \leq 0,001$), p : Seuil de signification.

VII.5. Effet sur l'activité de la superoxide dismutase (SOD)

Les résultats obtenus indiquent chez le lot NaF une baisse hautement significative au niveau des globules rouges, du foie et des testicules par rapport au témoin.

L'administration du NaF plus l'acide gallique a provoqué une augmentation hautement significative au niveau des globules rouges, et très hautement significative dans les testicules et le foie par rapport aux rats traités par le NaF.

Alors que le traitement par le NaF plus *Punica granatum* a provoqué une augmentation significative dans les globules rouges et très hautement significative au niveau du foie et des testicules comparativement au groupe NaF.

La co-administration du fluorure de sodium, de l'acide gallique et du *Punica granatum* a provoqué une élévation hautement significative au niveau et des globules rouges, et très hautement significative au niveau du foie et des testicules (Tableau 16, Figure 28).

Tableau 16 : Variation de l'activité enzymatique de la superoxide dismutase (SOD) (U/mg de protéines) dans : le foie, les reins, le cœur, les testicules et les globules rouges (GR) chez les rats témoins et les rats traités.

Paramètre	Organes	Lots expérimentaux					
		Témoin	NaF	NaF+AG	NaF+PG	NaF+AG+PG	PG
SOD (U/mg de protéines)	foie	0,82±0,1	0,57±0,02**	0,74±0,03###	0,71±0,06###	0,77±0,05###	0,9±0,08
	%		-30,49	-9,76	-13,41	-6,1	9,76
	%			29,82	24,56	35,09	
	Reins	1,11±0,12	0,8±0,05	0,93±0,13*	0,99±0,04###	0,91±0,05###	1,08±0,05
	%		-27,93	-16,22	-10,81	-18,02	-2,7
	%			16,25	23,75	13,75	
	Cœur	0,17±0,08	0,1±0,02	0,15±0,02#	0,13±0,01#	0,19±0,04##	0,16±0,02
	%		-41,18	-11,76	-23,53	11,76	-5,88
	%			50	30	90	
	Testicule	1,38±0,23	0,81±0,03**	1,41±0,19###	1,61±0,23###	1,6±0,23###	1,81±0,06**
	%		-41,30	2,17	16,66	15,94	31,16
	%			74,07	98,76	97,53	
	Globules Rouges	1,37±0,21	0,81±0,07**	1,11±0,17##	0,96±0,12###	1,05±0,1###	1,39±0,26
	%		-40,87	-18,98	-29,93	-23,36	1,46
	%			37,04	18,52	29,63	

* : Différence significative par rapport au témoin ($p \leq 0,05$), ** : Différence hautement significative par rapport au témoin ($p \leq 0,01$), # : Différence significative par rapport au NaF ($p \leq 0,05$), ## : Différence hautement significative par rapport au NaF ($p \leq 0,01$), ### : Différence très hautement significative par rapport au NaF ($p \leq 0,001$). p : Seuil de signification.

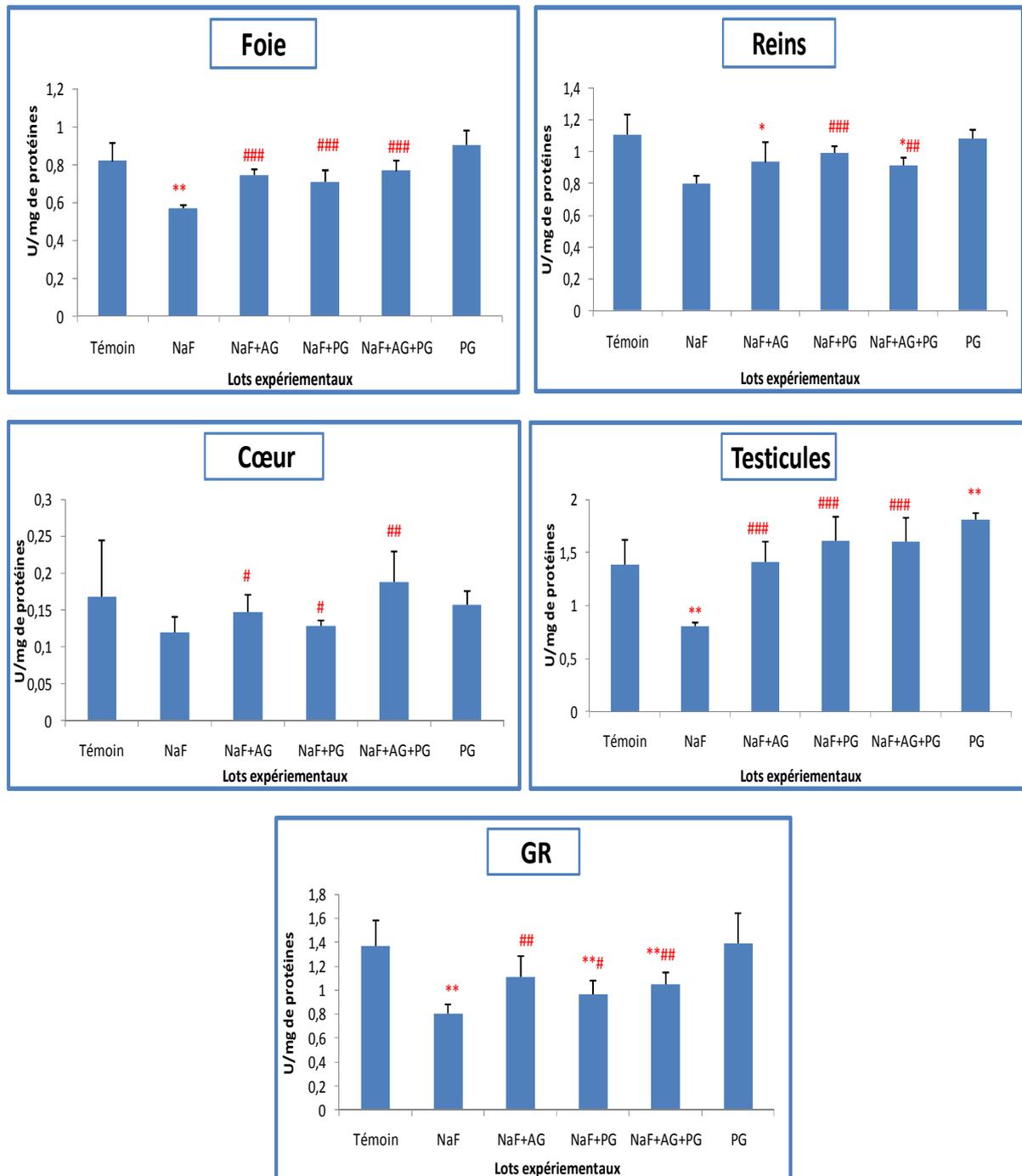


Figure 28 : Variation de l'activité enzymatique de la superoxide dismutase (SOD) (U/mg de protéines) dans : le foie, les reins, le cœur, les testicules et les globules rouges (GR) chez les rats témoins et les rats traités

* : Différence significative par rapport au témoin ($p \leq 0,05$), ** : Différence hautement significative par rapport au témoin ($p \leq 0,01$), # : Différence significative par rapport au NaF ($p \leq 0,05$), ## : Différence hautement significative par rapport au NaF ($p \leq 0,01$), ### : Différence très hautement significative par rapport au NaF ($p \leq 0,001$), p : Seuil de signification

❖ Discussion

Les dérivés réactifs de l'oxygène sont produits en faibles quantités de manière continue, ils semblent être impliqués dans les processus de phagocytose des bactéries par les cellules polynucléaires ainsi que les processus de signalisation cellulaires. En situation physiologique, il existe un équilibre parfait entre la production des ERO prooxydants et les antioxydants (Swain *et al.*, 2002).

Les résultats de nombreuses études ont prouvé que les fluorures sont à l'origine d'un stress oxydant induit par une production excessive des anions superoxyde (O_2^-), du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ainsi que des radicaux hydroxyles (OH^\cdot). De plus, les fluorures augmentent la génération du monoxyde d'azote (NO), et ils peuvent également interagir avec les superoxydes pour former le peroxynitrite ($ONOO^-$) (Liu *et al.*, 2003 ; Sireli et Bülbül, 2004 ; Hassan et Youssef, 2009).

D'autre part, l'exposition aux fluorures diminue ou même inhibe l'activité de plusieurs enzymes comme la catalase, la superoxyde dismutase ainsi que la glutathion peroxydase (García-Montalvo *et al.*, 2009).

Le glutathion est un thiol endogène qui joue un rôle majeur dans la protection contre les attaques radicalaires en agissant comme piègeur des espèces réactives de l'oxygène ou en jouant le rôle de cofacteurs de certaines enzymes antioxydantes (Schulz *et al.*, 2000).

Les résultats de notre étude montrent que l'administration du fluorure de sodium pendant trois semaines provoque une diminution importante du taux de glutathion réduit au niveau des quatre organes étudiés, et même au niveau érythrocytaire. Cette baisse peut être expliquée par la diminution de la synthèse de ce tripeptide et/ou sa dégradation intense ou bien par la diminutions de la régénération des molécules de GSH par la glutathion réductase qui nécessite le NADPH qui est à son tour consommé dans la voie des polyols.

La diminution de la concentration du GSH peut être expliquée également par sa consommation par la glutathion peroxydase lors de la détoxification des molécules de peroxyde d'hydrogène générées par le fluorure de sodium (Guney *et al.*, 2007).

Nos résultats ont été confirmés par des études précédentes. En effet **Nabavi *et al.*, (2013)** ont enregistré une diminution du taux de GSH chez des rats traités par le NaF. De même **Mittal et Flora, (2006)** ont observé une baisse de la teneur hépatique et rénale en GSH chez des souris Swiss traitées oralement par 5 mg/kg de fluorure de sodium pendant huit semaines.

Les acides gras polyinsaturés sont très susceptibles aux attaques radicalaires et génèrent des peroxydes lipidiques qui sont eux même très réactifs. La peroxydation des lipides fournit ainsi une grande variété de produits, dont le malondialdéhyde (MDA) qui est très étudié comme marqueurs de la peroxydation lipidique. Il est également prouvé que le fluorure traverse les membranes et pénètre dans les tissus tels que les reins, le cerveau et le foie. L'altération de la fonction des tissus mous observée chez les animaux intoxiqués par fluorures se manifeste par une augmentation de la peroxydation lipidique et une diminution de l'activité des enzymes antioxydantes (**Jacyszne et Marut, 1986**).

Dans nos conditions expérimentales, le traitement des rats par le fluorure de sodium a provoqué une augmentation très hautement significative de la teneur en MDA au niveau érythrocytaire ainsi que dans les organes étudiés. Ceci révèlent que le fluorure de sodium est capable d'induire la génération des radicaux libres notamment le radical hydroxyle qui peut initier les réactions en chaîne de la peroxydation lipidique. A son tour, l'augmentation de la peroxydation lipidique est à l'origine d'une perte de l'intégrité membranaire (**Panneerselvam *et al.*, 2013**).

Ces résultats sont en accord avec plusieurs autres études, en effet **Ri-An *et al.*, (2006)** ont montré que le traitement des rats par 50 mg/l de fluorure de sodium induit une élévation de la teneur en MDA au niveau rénal. **Pratap Reddy *et al.*, (2009)** ont trouvé que l'injection de 20 mg/kg de fluorure de sodium provoque une augmentation cérébrale de la teneur en malondialdéhyde chez les souris. De plus, **Altintas et ces collaborateurs (2009)** ont enregistré une augmentation de l'MDA au niveau des érythrocytes après un traitement des souris par 100 ppm de fluorure de sodium.

Nos résultats indiquent aussi chez les rats traités par le fluorure de sodium une baisse de l'activité enzymatique de la glutathion peroxydase, la catalase et la superoxyde dismutase, au niveau du foie, du cœur, des reins, des testicules et même au niveau des globules rouges.

La diminution de l'activité de la GPx ainsi que celle de la catalase est essentiellement due à une surproduction de peroxyde d'hydrogène induite par le fluorure de sodium et l'utilisation de ces deux enzymes dans la conversion de cette espèce réactive de l'oxygène en eau. Elles pourraient être liées à un épuisement des molécules de glutathion réduit, et du NADPH indispensable au bon fonctionnement de la glutathion peroxydase et de la catalase respectivement.

Alors qu'on peut expliquer la diminution de l'activité de la superoxyde dismutase par l'interaction du fluorure de sodium avec cette enzyme où il entre en compétition avec les ions du zinc et du magnésium nécessaires au fonctionnement de la SOD (**Basha Mahaboob et al., 2011**). **Verma et Guna Sherlin, (2002)** ont rapporté que le fluorure de sodium présente une grande affinité vis-à-vis de plusieurs éléments notamment le cuivre, le zinc, le manganèse et le magnésium nécessaires au bon fonctionnement des enzymes antioxydantes.

Plusieurs autres études ont prouvé l'effet inhibiteur du fluorure de sodium sur les enzymes antioxydantes. En effet, **Panneerselvam et al., (2013)** ont trouvé qu'un traitement par 25 mg/l durant douze semaines induit l'inhibition de la GPx, la catalase ainsi que la superoxyde dismutase hépatiques, chez le rat. **Hassan et Abdel-Aziz (2010)** ont aussi enregistré une diminution de l'activité de la superoxyde dismutase au niveau des globules rouges, des reins et des testicules après un gavage des rats par 10.3 mg/kg de fluorure de sodium pendant cinq semaines.

En plus de leurs effets bénéfiques sur les paramètres hématologiques et biochimiques, le jus de *Punica granatum* ainsi que l'acide gallique possèdent des effets protecteurs sur les paramètres de stress oxydant. Au cours de notre étude, nous avons remarqué que le co-traitement des rats par le jus de *Punica granatum* et/ou l'acide gallique entraîne une augmentation du taux du GSH et de l'activité enzymatique de la GPx, la CAT et la SOD.

Ces améliorations pourraient être expliquées par la capacité antioxydante du jus de la grenade et de l'acide gallique vis-à-vis des radicaux libres, dont la synthèse est induite par le fluorure de sodium.

Il a été prouvé que la consommation du jus de *Punica granatum* engendre une augmentation du taux du GSH accompagnée d'une diminution de la peroxydation lipidique. **Matthaiou et al., (2014)** suggèrent que ce jus induit l'expression et/ou l'activation des enzymes impliquées dans la biosynthèse comme la glutamate cystéine ligase et la GSH synthétase.

Des études récentes ont attribué l'effet antioxydant de ce jus à sa richesse en polyphénols comme les acides hydroxybenzoïque, les anthocyanines et leurs dérivés. (**Gil et al., 2000; Cerda et al., 2003 ; El-Falleh et al., 2011; Li et al., 2014**). **Seeram et al. (2005)** ont attribué le potentiel antioxydant du jus de *Punica granatum* à la présence d'un taux élevé en ellagitanins et en acides ellagiques. Il a été rapporté également que le jus de *Punica granatum* est une importante source de plusieurs oligoéléments et vitamines qui jouent le rôle de cofacteurs des enzymes antioxydantes, ce qui confère à ce jus un pouvoir scavengeur important (**Lim, 2013**).

De même, l'activité antiradicalaire de l'acide gallique a été également prouvée expérimentalement. **Korani et al., (2014)** ont trouvé que l'administration de 100 mg/kg pendant dix jours augmente l'activité de la GPx cérébrale et diminue la concentration en MDA. **Punithavathi et al., (2011)** ont observé que le traitement des rats par 20 mg/kg et 40 mg/kg de l'acide gallique durant 21 jours, améliore l'activité enzymatique de la GPx, la CAT et de la SOD au niveau pancréatique.

Chapitre VIII : Impact du fluorure de sodium sur l'histologie et effet protecteur de la suppléments en acide gallique et/ou le jus de *Punica granatum*.

VIII.1. Etude histologique du foie

L'étude histologique du foie illustrée par la figure 29 indique chez les rats traités par le fluorure de sodium une importante infiltration inflammatoire lympho-plasmocytaire accompagnée d'une ectasie vasculaire. Ces altérations sont moins importantes chez les rats traités par l'acide gallique et/ou le jus de *Punica granatum*.

VIII.2. Etude histologique des reins

L'histologie des reins montre que l'administration du fluorure de sodium provoque une infiltration inflammatoire modérée. La co-administration de l'acide gallique et/ou le jus de *Punica granatum* a causé une infiltration inflammatoire discrète (Figure 30).

VIII.3. Etude histologique du cœur

L'étude histologique du cœur indique une ectasie vasculaire chez les rats du groupe NaF. Alors que une discrète infiltration inflammatoire est observée chez le groupe NaF+PG et le groupe NaF+AG+PG. Les rats du groupe NaF+AG présentent un tissu cardiaque normal (figure 31).

VIII.4. Etude histologique des testicules

L'histologie des testicules montre des œdèmes chez les rats traités par le fluorure de sodium. Par contre des œdèmes très discrets ont été observés chez les rats traités par l'acide gallique et/ou le jus de *Punica granatum* (Figure 32).

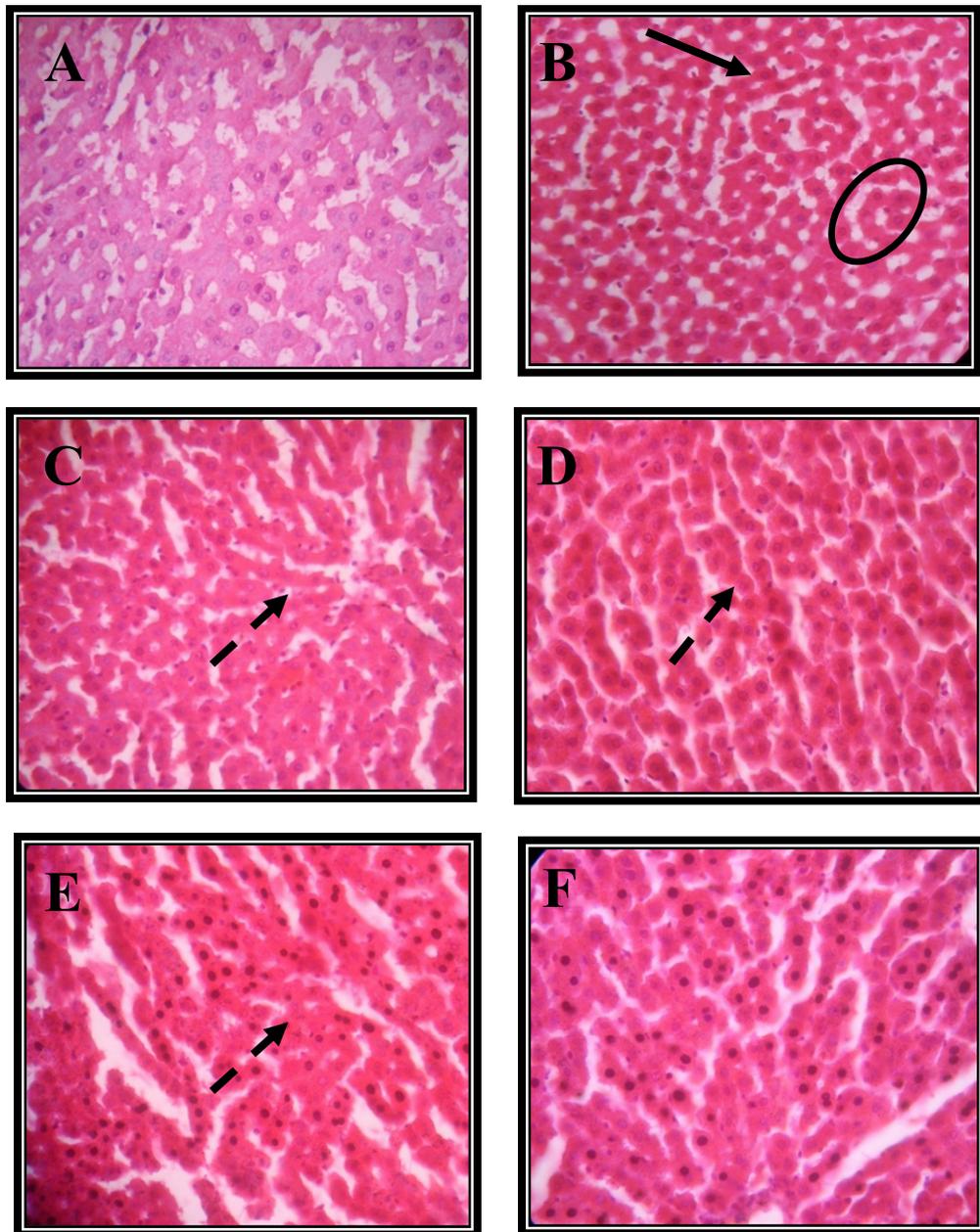


Figure 29 : Coupes histologiques du foie (EHx400): (A) Témoin, (B) NaF, (C) NaF+AG, (D) NaF+PG, (E) NaF+AG+PG, (F) PG.

Infiltration inflammatoire importante 

Infiltration inflammatoire modérée 

Ectasie vasculaire 

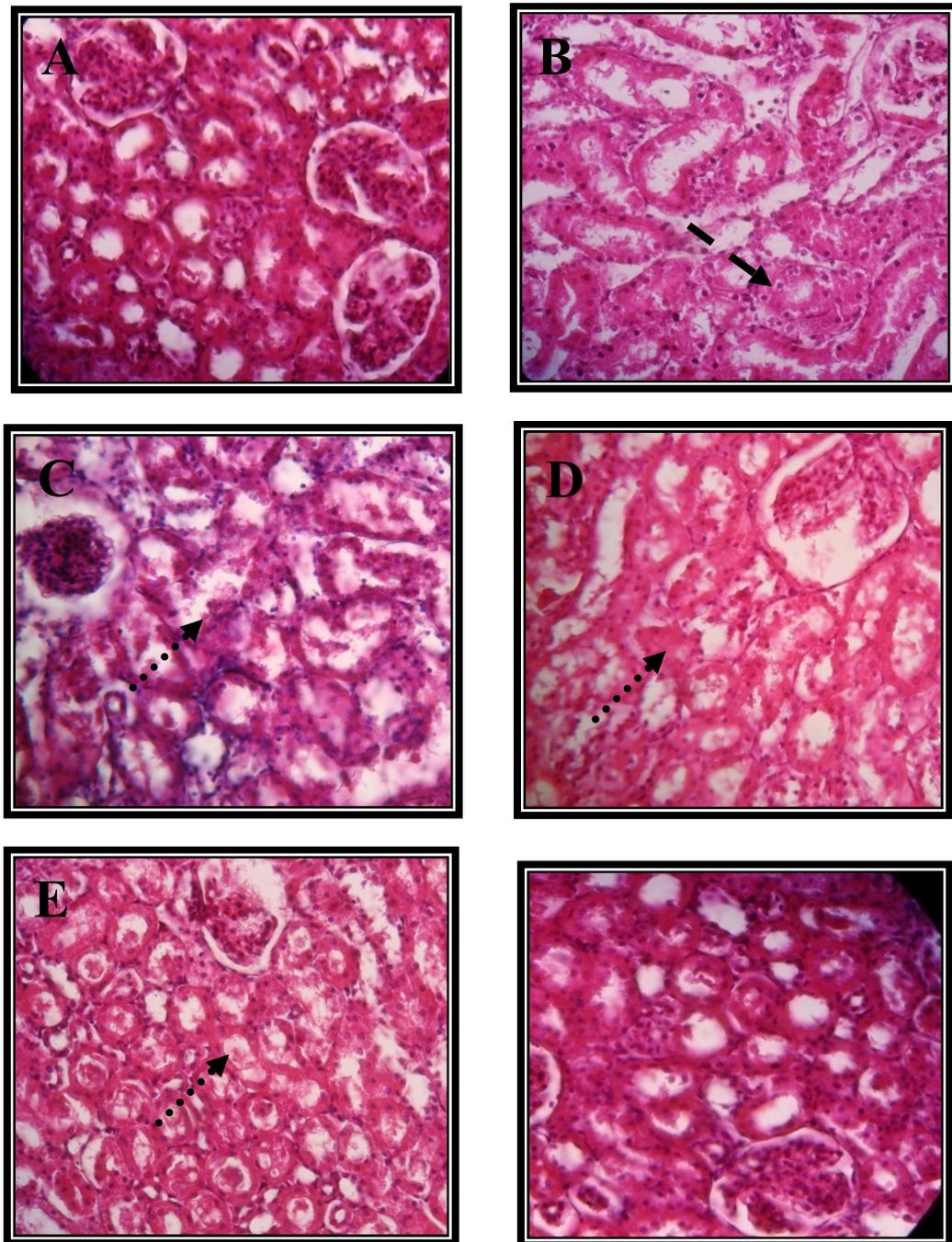


Figure 30: Coupes histologiques des reins (EH×400): (A) Témoin, (B) NaF, (C) NaF+AG, (D) NaF+PG, (E) NaF+AG+PG, (F) PG.

Infiltration inflammatoire modérée - - - - ->

Infiltration inflammatoire discrète >

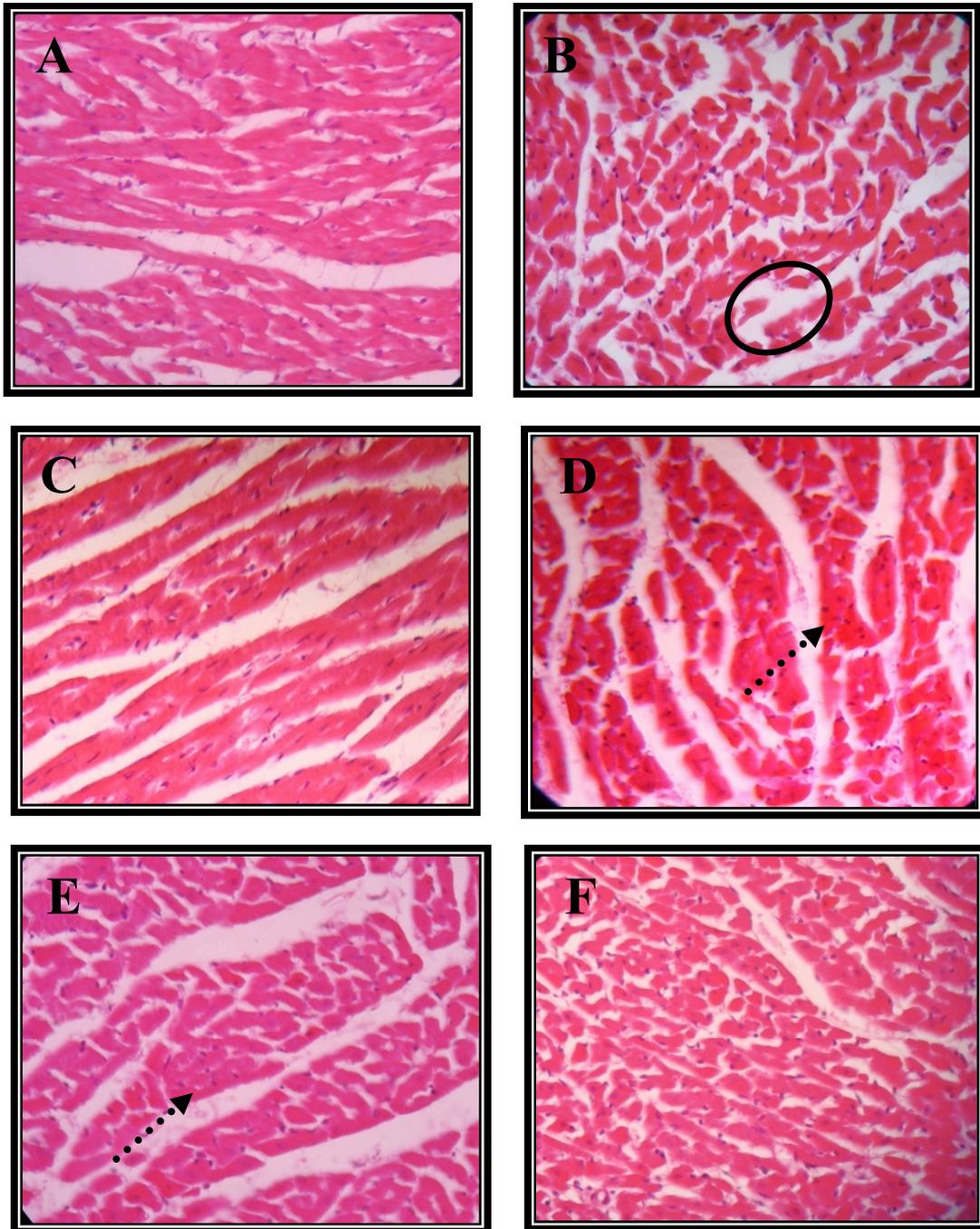


Figure 31 : Coupes histologiques du cœur (EH×400): (A) Témoin, (B) NaF, (C) NaF+AG, (D) NaF+PG, (E) NaF+AG+PG, (F) PG.

Infiltration inflammatoire discrète ▶

Ectasie vasculaire ○

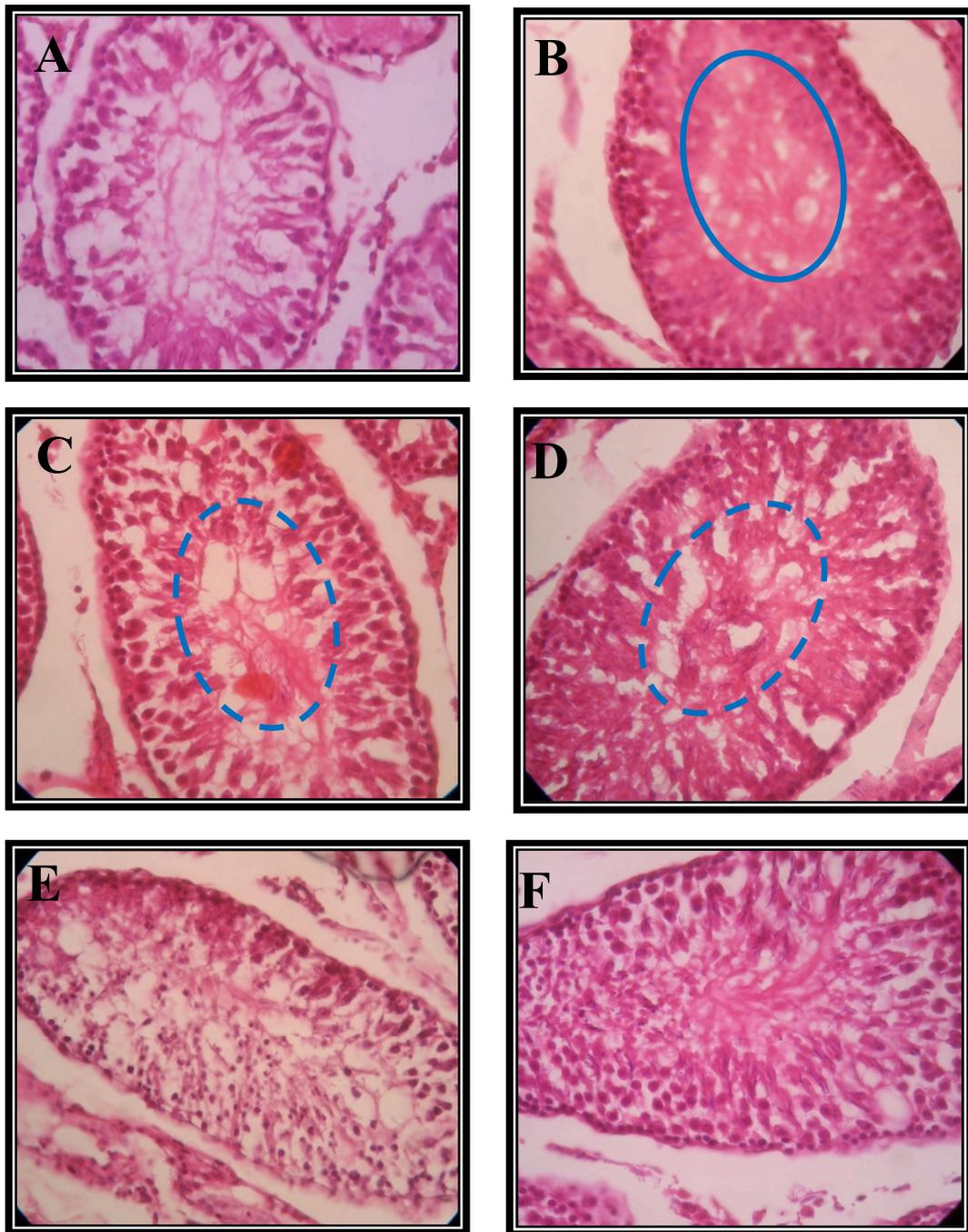


Figure 32 : Coupes histologiques des testicules (EH×400): (A) Témoin, (B) NaF, (C) NaF+AG, (D) NaF+PG, (E) NaF+AG+PG, (F) PG.

Œdème



Œdème discret



❖ Discussion

Les résultats de l'analyse biochimique et hématologique ont été confirmés par l'étude histologique que nous avons réalisé. Cette dernière révèle que la toxicité du fluorure de sodium s'est manifestée par des atteintes tissulaires importantes. En effet, le traitement des rats par 100 ppm de fluorure de sodium pendant trois semaines a provoqué une infiltration inflammatoire importante, modérée et discrète au niveau du foie, des reins et du cœur respectivement. On a observé aussi des ectasies vasculaires au niveau du foie et du cœur. L'étude histologique des testicules a montré des œdèmes. Ces altérations sont induites suite à une peroxydation lipidique provoquée par les radicaux libres générés par le fluorure de sodium.

Il a été signalé dans d'autres travaux que l'administration du fluorure de sodium entraîne une dégénérescence hépatique qui peut se développer en nécrose (**Kolodziejczyk et al., 2000 ; Dabrowaska et al., 2006**). L'impact du fluorure de sodium sur les testicules a fait aussi l'objet d'une étude antérieure, au cours de laquelle, il a été observé que le traitement par 20 ppm de NaF (pendant 29 jours) altère l'histologie testiculaire et engendre une dilatation des tubules séminifères (**Ghosh et al., 2002**).

En revanche, la supplémentation en Acide gallique et/ou en jus de *Punica granatum* a légèrement préservé les structures cellulaires des organes étudiés. Ce qui peut être attribué à l'effet préventif contre les radicaux oxygénés de ces deux antioxydants, exercé au niveau du tissu : hépatique, rénal, cardiaque, et testiculaire (**Parmar et kar, 2007 ; Abdel Moneim et El-Khadragy, 2013**).

Le pouvoir protecteur de *Punica granatum* contre les lésions tissulaires provoquées par les xénobiotiques prooxydants a été bien prouvé au cours d'autres études. **Al-Olayan et al., (2014)** ont mentionné que les polyphénols et les flavonoïdes contenus dans le jus de *Punica granatum* peuvent réduire la toxicité du CCl₄ au niveau testiculaire en diminuant l'inflammation et dégénérescence de ces cellules. Un effet similaire a été observé au niveau cardiaque chez des rats intoxiqués par l'isoproterenol (**Jaeja et al., 2010**).

De même, il a été précédemment démontré que l'administration de l'acide gallique restaure les dommages tissulaires chez le rat (**Abarikwu *et al.*, 2014**).

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Conclusion et Perspectives

Nos résultats montrent dans un premier temps que le jus de l'espèce locale *Punica granatum* contient des phénols, des flavonoïdes et des tanins. Ces composés sont à l'origine d'une activité antioxydante.

Ils montrent également que l'administration quotidienne de 100 ppm de fluorure de sodium pendant trois semaines a provoqué des perturbations métaboliques et des atteintes d'organes. En revanche le traitement des rats par l'acide gallique, le jus du *Punica granatum* ou par leur combinaison a amélioré ces perturbations. L'ensemble des effets observés peut être résumé dans les points suivants :

- Une croissance normale des rats de tous les groupes expérimentaux accompagnée d'une augmentation du poids relatifs du foie chez les rats traité par le fluorure de sodium comparativement aux rats témoins.
- Une perturbation des paramètres hématologiques chez le groupe traité par le fluorure de sodium. Le traitement des rats par l'acide gallique et/ou le jus du *Punica granatum* a amélioré ces perturbations.
- Une diminution de la concentration sérique de la bilirubine totale, de l'albumine et des protéines totales chez le groupe NaF. La co-administration de l'acide gallique ou du jus du *Punica granatum* a augmenté ces concentrations.
- Une augmentation de l'activité enzymatique de l'ASAT, l'ALAT, PAL, LDH ainsi que des CPK chez les rats traités par le fluorure de sodium. En revanche le traitement par l'acide gallique ou par le jus du *Punica granatum* a atténué ces activités avec efficacité remarquable.

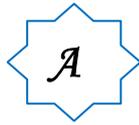
- Une augmentation du cholestérol, des triglycérides et des VLDL et une diminution de celui de HDL chez le lot NaF. Alors que le traitement par l'acide gallique et/ou du jus du *Punica granatum* a amélioré ces paramètres.
- Une augmentation de la teneur sérique en urée, créatinine et en acide urique chez les rats traités par NaF. Le co-traitement par l'acide gallique et/ou du jus du *Punica granatum* a diminué ces valeurs.
- Une hyperglycémie accompagnée d'une augmentation du taux du fer sérique chez les rats du groupe traité par le NaF. Le co-traitement par l'acide gallique et/ou du jus du *Punica granatum* a provoqué une diminution de la concentration du glucose et du fer.
- Une diminution de la concentration de la T₃, de la T₄ et de la testostérone après traitement par le fluorure de sodium. Le co-traitement par l'acide gallique et/ou du jus du *Punica granatum* a augmenté le taux de ces hormones.
- Une diminution de la teneur en glutathion réduit ainsi que l'activité enzymatique de la GPx, la CAT, la SOD avec une augmentation de l'MDA dans tous les organes étudiés des rats traités par le fluorure de sodium. Après traitement par l'acide gallique et/ou du jus du *Punica granatum* on a remarqué une augmentation considérable du glutathion réduit ainsi que l'activité enzymatique des différentes enzymes, expliquée par l'effet antioxydant.
- L'histologie des organes étudiés (foie, reins, cœur et testicules) a montré des atteintes remarquables chez les rats traités par le NaF. Par contre, le traitement par l'acide gallique et/ou du jus du *Punica granatum* a exercé un effet cyto-protecteur au niveau de ces organes.

En perspectives il s'avère intéressant d'approfondir ces conclusions par :

- L'exploration d'autres biomarqueurs du système radicalaire et le pouvoir antioxydant.
- La purification et la caractérisation des principes actifs contenus dans le jus de *Punica granatum* qui peuvent être à l'origine de l'effet antioxydant.
- Le dosage des hormones rénales impliquées dans l'hématopoïèse, à savoir l'érythropoïétine et la thrombopoïétine.
- L'exploration des métallothionéines ainsi que les protéines stress : les heat shock proteins (HSP).

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

Références Bibliographiques



Abarikwu S.O., Akiri O.F., Durojaiye M.A., Alabi A.F. (2014). Combined administration of curcumin and gallic acid-induced suppression of steroidogenesis, sperm output, antioxidant defenses and inflammatory responsive genes. *J. Steroid Biochem. Mol. Bio.* 143 : 49-60.

Abbot B. et al. (1984). **Creatinine kinase.** *Clin Chem The C.V. Mosby Co. St Louis. Toronto. Princeton.* 1:112-116.

Abdel Moneim A.E., El-Khadragy M.F. (2013). The potential effects of pomegranate (*Punica granatum*) juice on carbon tetrachloride-induced nephrotoxicity in rats. *J. Physiol. Biochem.* 69:359-370.

Aebi, H. (1974). Catalase in vitro. *Method. Enzymol.* 105:673-884.

Afonso V., Chamly R., Mitrovic D., Collin P., Lomri A. (2007). Radicaux libres dérivés de l'oxygène et superoxydes

dismutases: rôle dans les maladies rhumatismales. *Rev. Rhumat.* 74 :636-643.

Agalakova, N.I., Gusev, G.P. (2013). Excessive fluoride consumption leads to accelerated death of erythrocytes and anemia in rats. *Biol. Trace. Elem. Res.* 153: 340-349.

Ahmed M.A.E., ElMorsy E.M., Ahmed A. A.E. (2014). Pomegranate extract protects against cerebral ischemia/reperfusion injury and preserves brain DNA integrity in rats. *Life Sci.* 110 : 61-69.

Ait Youssef M. (2006). *Plantes médicinales de Kabylie.* Edition Ibis Press. Paris. PP: 271-273.

Ajaikumar K.B., Asheef M., Babu B.H., Padikkala J. (2005). The inhibition of astric mucosal injury by *Punica granatum* L. (pomegranate) methanolic extract. *J. ethnopharmacol.* 96 (1-2): 171-176.

Al-Hiyasat A.S., Elbeticha A.M., Darmani H. (2000). Reproductive toxic effects of ingestion of sodium fluoride in female rats. *Fluoride*. 33: 79-84.

Al-Olayan1 E.M., El-Khadragy M.F., Metwally D.M., Abdel Moneim A.E. (2014). Protective effects of pomegranate (*Punica granatum*) juice on testes against carbon tetrachloride intoxication in rats. *BMC. Complement. and Alternative Med.* 14:164-173.

Altintas L., Essiz D., Eraslan G., Ince S., Arslanbas E. (2010). Prophylactic effect of N-acetylcysteine against sodium fluoride-induced blood oxidative stress in mice. *Food Chem. Toxicol.* 48 : 2838-2841.

Al-Zahrani S.H.M. (2012). Antibacterial activities of gallic acid and gallic acid methyl ester on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Americ Sci.* 8(2):7-12.

Anjum K. M., Yaqub A., Mumtaz N., Sayyed U., Asad M., Ali Khan S. (2010). Effect of acute fluoride intoxication on some hematological changes in chicken (*Gallus domesticus*). *Biologia (pakistan)*. 56 (1-2): 123-127.

Anke M., Groppe B., Krause U. (1991). Fluorine deficiency in goats. In: Moncilovic B. Trace elements in man and animals. T.E.M.A .7. Zagreb. University of Zagreb : 26-28.

Asada, K., Takahashi,M., Nagat, M. (1974). Assay and inhibitors of spinach superoxide dismutase. *Agric. Biol. Chem.* 38: 471-47.

Aviram M., Rosenblat M., Gaitini D., Nitecki S., Hoffman A., Dornfeld L., Volkova N., Presser D., Attias J., Liker H., Hayek T. (2004) Pomegranate juice consumption for 3 years by patients with carotid artery stenosis reduces common carotid intima-media thickness, blood pressure and LDL oxidation. *Clin. Nutr.* 23(3): 423-433.



Bagri P., Mohd. Ali M., Aeri V., Bhowmik M., Sultana S. (2009). Antidiabetic effect of *Punica granatum* flowers: Effect on hyperlipidemia, pancreatic cells lipid peroxidation and antioxidant enzymes in experimental diabetes. *Food Chem. Toxicol.* 47 : 50-54.

Banihani S.A., Makahleh S.M., El-Akawi Z., Al-Fashtaki R.A., Khabour O.F., Gharibeh M.Y., Saadah N.A., Al-Hashimi F.H., Al-Khasieb N.J. (2014). Fresh pomegranate juice ameliorates insulin resistance, enhances β -cell function, and decreases fasting serum glucose in type 2 diabetic patients. *Nutr. Res.* 34 : 862-867.

Barbier O., Arreola-Mendoza L., Del Razo L.M. (2010). Molecular mechanisms of fluoride toxicity. *Chem-Biol. Interact.* 188: 319-333.

Barouki R. (2006). Stress oxydant et vieillissement. *Méd Sci.* 22 : 266-272.

Basha Mahaboob P., Rai P., Begum S. (2011). Evaluation of fluoride-induced oxidative stress in rats brain : A multigeneration study. *Biol. Trace Elem. Res.* 142 : 623-626.

Beaudeau J.L., Dallatre J., Thérond P., Bonnefont Rousselot D., Legrand A., Peynet J. (2006). Le stress oxydant, composante physiopathologique et athérosclérose. *IBS.* 21 : 144-150.

Beaudeau J.L., Durand G. (2011). Biochimie médicale Marqueurs actuels et

perspectives. 2^{ème} édition Médecine Science, Lavoisier. Pais. PP : 115-133.

Belkacem N., Djaziri R., Lahfa F., El-Haci I.A., Boucherit Z. (2014). Phytochemical screening and in vitro antioxidant activity of various *Punica granatum* peel extracts from Algeria: a comparative study. *Phytothérapie.* 12: 372-379.

Beloued A. (1998). Plantes médicinales d'Algérie. O.P.U. Alger. P : 112.

Berliner J.A., Heineche J.W. (1996). The rôle of oxidized lipoproteins in atherogenesis. *Free Rad. Bio. Med.* 20: 707-727.

Berry, C. E., Hrae J.M. (2004). Xanthine oxidoreductase and cardiovascular disease: molecular mechanisms and pathophysiological implications. *J. Physiol.* 555(3): 589-606.

Bézanger L., Pinkas M. Torck M., Trotin F. (1980). Plantes médicinales des régions tempérées. Édition Maloine. P: 222.

Bhardwaj M., Aggarwal S. (2013). Evaluation of biochemical interaction and correlation between high fluoride

ingestion and protein metabolism. *Biomed. Prevent. Nutr.* 3:129-137.

Bhourri, W., Boubaker, J., Skandrani, I., Ghedira, K., Ghedira, L.C. (2012). Investigation of the apoptotic way induced by digallic acid in human lymphoblastoid TK6 cells. *Cancer Cell. Int.* 12 : 1-8.

Blois, M.S. (1958). Antioxidant determination by the use of stable free radical. *Nature.* 26:199-200.

Bonnefont Rousselot D., Peynet J., Beaudoux J-L., Thérond P., Legrand A., Dallatre J. (2002). Oxidatif stress, vasculars functions and atherosclerosis. *Nutr. Clin. Métab.* 16: 260-267.

Bonnefont Rousselot D., Thérond P., Dallatre J. (2003). Radicaux libres et antioxydants. *Méd. Sci. (02)* : 23-30.

Bonnefont Rousselot D. (2007). Stress oxydant et vieillissement. *Spectra Biol.* 157 : 23-26.

Borges A., Ferreira C., Saavedra MJ., Simoes M. (2013). Antibacterial activity and mode of action of ferulic and gallic acids against pathogenic bacteria. *Microb. Drug Resist.* 00:1-10.

Bouaziz, H., Fatoui, H., Ketata, S., Jammoussi, K., Ellouz, F. Zeghal, N. (2006_a). Effects of sodium fluoride ingested by lactating mice on some haematological parameters in suckling pups and dams. *Res. Rep. fluoride.* 39 (3): 211-219.

Bouaziz N., Ketata S., Jammoussi K., Boudawara T., Ayedi F. Ellouze F., Zeghal N. (2006_b). Effects of sodium fluoride on hepatic toxicity in adult mice and their suckling pups. *Pesticide Biochem. Physiol.* 86: 124-130.

Bouaziz H., Croute F., Tahia Boudawara T.,Soleilhavoup J.P., Zeghal N. (2007). Oxidative stress induced by fluoride in adult mice and their suckling pups. *Exp. Toxicol. Pathol.* 58: 339-349.

Boullard B. (2001). Dictionnaire: Plantes médicinales du monde, réalités et croyance. Edition ESTEM. Paris. PP : 437, 438.

Bradford M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantities of microgram quantities of protein utilizing the principal of protein binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.

Bredt D.S., Hwang P.M., Snyder S.H. (1990_a). Synthase indicating a neural role for nitric-oxide. *Nature*. 347(6295): 768-770.

Bredt D.S., Hwang P.M., Snyder S.H. (1990_b). Isolation of nitric-oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87(2): 682-685.

Brosse J. (2000). *Larousse des arbres et des arbustes*. Edition Larousse. Canada. PP : 374, 375.

Bruneton J. (1999). *Pharmacognosie - Phytochimie, Plantes médicinales*, 3^{ème} édition Tec & Doc. Paris. PP : 860, 1012.

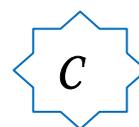
Brzozowska J., Hanower P. (1976). Sur les composés phénoliques des végétaux et leur rapport avec un déficit hydrique chez des cotonniers. *Annales de l'Université d'Abidjan, série C (Sciences)*, tome XII : 65-87.

Buccolo, G. et al. (1973). Quantitative determination of serum triglycerides by use of enzymes. *Clin. Chem.* 19(5): 476-482.

Buege, JA., Aust, SD. (1984). Microsomal lipid peroxidation. *Method Enzymol.* 105: 302-310.

Burnie G. (1997). *Botanica : encyclopédie de botanique et d'horticulture plus de 10000 plantes du monde entier*. Edition Könemann. P : 723.

Burtis A. et al. (1999). *Tietz textbook of clinical chemistry*. 3rd Ed AACC.



Cartron E., Fouret G., Carbonneau M.A., Lauret C., Michel F., Monnier L., Descomps B., Léger C.L. (2003). Red-wine beneficial long-term effect on lipids but not on antioxidant characteristics in plasma in a study comparing three types of wine description of two O-methylated derivatives of gallic acid in humans. *Free Radic. Res.* 37(9): 1021-35.

Cerda, B., Ceron, J.J., Tomas-Barberan, F.A., Espin, J.C. (2003). Repeated oral administration of high doses of the pomegranate ellagitannin punicalagin to rats for 37 days is not toxic. *J. Agric. Food Chem.* 51: 3493–3501.

Changjiang G., Jijun Y., Jingyu W., Yunfeng L., Jing X., Yugang J. (2003). Antioxidant activities of peel, pulp and seed fractions of common fruits as

determined by FRAP assay. *Nutr. Res.* 23: 1719-1726.

Chapuis P. (1991). Les oligoéléments en médecine et biologie. Edition Lavoisier Tec et Doc. Paris PP : 239-246, 556-571.

Chem K., Suh J., Carr A.C., Morrow J.D., Zeindj Frei B. (2000). Vitamin C suppresses oxidative lipid damage in vivo, even the presence of iron overload. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 279 (6): 1406-1412.

Chiou C.C., Chang P.Y., Chan E.C., Wu T.L., Tsao K.C., Wu J.T. (2003). Urinary 8 hydroxydeoxyguanosine and its analogs as DNA markers of oxidative stress : development of ELISA and mesurment in both bladder and prostate cancer. *Clin.Chem.Acta.* 334: 87-94.

Clement R.P. (2005). Aux racines de la phytothérapie: entre tradition et modernité. *Phytothérapie.* 4: 171-174.

Coles, B.F. and Kadlubar, F.F. (2003). Detoxification of electrophilic compounds by glutathione S-transferase catalysis: Determinants of individual response to chemical carcinogens and

chemotherapeutic drugs?. *Biofactors.* 17: 115-130.

Collins T.F.X., Sprando R.L., Black T.N., Shackelfod M.E. Bryant M.A., Olejnik N., Ames M.J., Rorie J.I., Ruggles D.I. (2001). Multigenerational evaluation of sodium fluoride in rat. *Food Chem. Toxicol.* 39: 601-613.



Dabrowaska E., Letko R., Balunowska M. (2006). Effect of sodium fluoride on the morphological picture of the rat liver exposed to NaF in drinking water. *Adv. Med. Sci.* 51: 91-95.

Das A.K., Mandal S.C., Banerjee S.K., Sinha S., Das J., Saha B.P. (1999). Studies on antidiarrhoeal activity of *Punica granatum* seed extract in rats. *J. Ethnopharmacol.* 68 (1-3): 205-208.

De Beer D., Joubert E., Gelderblom W.C., Manley M. (2003). Antioxidant activity of South African red and white cultivar wines: free radical scavenging. *J. Agric. Food Chem.* 51(4): 902-909.

Debjit B., Harish G., Pragati K.B., Duraivel S., Aravind G., Sampath K. P. (2013). Medicinal uses of *Punica*

granatum and its health benefits. J. Pharmacog. Phytochem. 1(5) : 28-35.

Defraigne J.O., Pincemail J. (2007). Stress oxydant et antioxydants: mythes et réalités. Rev. Med. Liège. 62 (4):1-10.

De-Nigris F., Williams-Ignarro S., Lerman L., et al. (2005) Beneficial effects of pomegranate juice on oxidation-sensitive genes and endothelial nitric oxide synthase activity at sites of perturbed shear stress. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 102 (13): 4896-4901.

De-Reynal B., Multon J.L. (2009). Additifs et auxiliaires de fabrication dans les industries agroalimentaires 4^{ème} édition Tec et Doc. Paris. P : 205.

Descheemaeker K. (2004). Nutrition et Phytothérapie. Développements récents 4^{ème} édition Garant. Paris. P: 46.

Desfontaine J. (2002). La prévention de la carie : Le fluor. Rev. Orthop. Dento-faciale 36 : 335-350.

Díaz-Gómez R. , López-Solís R., Obreque-Slier E., Toledo-Araya H. (2013). Comparative antibacterial effect of gallic acid and catechin against

Helicobacter pylori. Food Sci. Technol. 54: 331-335.

Dingge L., Chuanqin S., Li S. (1999) Study on the antioxidant activity and blood lipid regulatory function of pomegranate leaf. J. of Shandong University of TCM. 23(5): 380-381.

Dodge, J.T., Mitchell,C., Hanaman,D.J. (1963). The preparation and chemical characteristics of haemoglobin free ghosts of human erythrocytes. Arch. Biochem. Biophys. 100: 119-130.

Doumas B. (1971). Clin. Chim. Acta. 31: 87-96.

Dorman H.J.D. (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oil. J. Applied Microbiol. 88: 308-316.



Ekstrand J., Koch G., Petersson L.G. (1983). Plasma fluoride concentration in pre-school children after ingestion of fluoride tablet's and tooth paste. Caries Res. 17: 379-384.

El-falleh W., Tlili N., Nasri N., Yahia Y., Hannachi H., Chaira N. (2011). Antioxidant capacities of phenolic compounds and tocopherols from Tunisian pomegranate (*Punica granatum*) fruits. *J. Food Sci.* 76 (5) :707-713.

Ellman G.L. (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* 82:70-77.

Ersoy I.H., Alanoglu E.G., Koroglu B.K., Varol S., Akcay S., Ugan Y., Ersoy S., Tamer M.N.(2010). Effect of endemic fluorosis on hematological parameters. *Biol. Trace Elem. Res.* 138:22-27.

Esmail Z.A.F., Tabaz I., Gaieni H., Alavi M., Azadbakht L. (2006). Cholesterol-lowering effect of concentrated pomegranate juice consumption in type II diabetic patients with hyperlipidemia. *Int J. vitam. Nutr. Res.* 76: 147-51.



Farbood Y., Sarkaki A., Hashemi S, Mansouri M.T., Dianat M. (2013). The effects of gallic acid on pain and memory following transient global

ischemia/reperfusion in Wistar rats. *Avicenna J. Phytomed.* 3(4): 329-340.

Favier A. (2003). Le stress oxydant. *L'actualité chimique.* Novembre-décembre: 108-115.

Fawcett J.K. et al. (1960). *J. Clin. Path.* 13: 156-169.

Fréjaville J.P., Bismuth C., Conso F. (1981). *Toxicologie Clinique.* 3^{ème} édition Flammarion. France. PP: 425-426.

Fischmann T. O., Hruza A., Niu X. D., Fossetta J. D., Lunn C. A., Dolphin E., Prongay A. J., Reichert P., Lundell D. J., Narula S. K. and Weber P. C. (1999). Structural characterization of nitric oxide synthase isoforms reveals striking active-site conservation. *Nat. Struct. Biol.* 6 (3): 233-242.

Flohe L., Gunzler W.A. (1984). Analysis of glutathione peroxidase. *Method Enzymol.* 105:114-121.

Fontaine E., Bernaud D., Schwebel C., Lerverve X. (2002). Place des antioxydants dans la nutrition du patient septique. *Réanimation.* 11: 411-420.

Fontaine E. (2007). Traité de nutrition artificielle de l'adulte : Chapitre 19 : Radicaux libres. Edition Springer Verlage. France. PP : 251-257.

Fossati P. et al. (1980). Clin. Chem. 26 : 227-231.

Fossati P. et al. (1982). Clin. Chem. 28(10) : 2077-2080.

Fournier P. (1999). Le livre des plantes médicinales et vénéneuses de France (Connaissance et mémoires européennes), tome II. Edition C.M.E. PP: 286-291.



Galan P., Preziosi P., Triol I., Valeix P., Vasquez C., Alfarez M.J., Hercberg S. (1997). Antioxydants et prévention. Med Nutri.5 : 23-30.

Garait B. (2006). Le stress oxydant induit par voie métabolique (régimes alimentaires) ou par voie gazeuse (hyperoxie) et effet de la GliSODin. Thèse de Doctorat. Université Joseph Fournier. P : 21.

García-Montalvo E.A., Reyes-Pérez H., Del Razo L.M. (2009). Fluoride exposure impairs glucose tolerance via decreased

insulin expression and oxidative stress. Toxicology. 263: 75-83.

Gerhardt W et al. (1979). Creatine kinase B-Subunit activity in serum after immune-hinhibition of M-Subunit activity. Clin. Chem. (25/7): 1274-1280.

Ghosh D., Das(Sarkar) S., Maiti R., Jana D., Das U.B. (2002). Testicular toxicity in sodium fluoride treated rats: association with oxidative stress. Reprod. Toxicol. 16: 385-390.

Ghosh J, Das J., Manna P., Sil P.C. (2008). Cytoprotective effect of arjunolic acid in response to sodium fluoride mediated oxidative stress and cell death via necrotic pathway. Toxicologie. *in vitro* 22 : 1918-1926.

Gil M.I., Tomas-Barberan F.A., Hess-Pierce B., Holcroft D.M., Kader A.A. (2000). Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. J. Agric. Food Chem. 48: 4581-4589.

Goudable J., Favier A. (1997). Radicaux libres oxygénés et antioxydants. Nut.Clin. Metabolism. 11: 115-120.

Gow-Chin Y., Pin-Der D., Hui-Ling T. (2002). Antioxidant and pro-oxidant properties of ascorbic acid and gallic acid. *Food Chem.* 79: 307-313.

Grove T.H. (1979). Effect of reagent pH on determination of HDL cholesterol by precipitation with sodium phosphotungstate-magnesium. *Clin. Chem.* 25: 560.

Guney M., Oral B., Take G., Giray S.G., Mungan T. (2007). Effect of fluoride intoxication on endometrial apoptosis and lipid peroxidation in rats: role of vitamins E and C. *Toxicology.* 231: 215-223.

Guo C., Wei J., Yang J., Xu J., Pang W., Jiang Y. (2008). Pomegranate juice is potentially better than apple juice in improving antioxidant function in elderly subjects. *Nutr. Res.* 28 : 72-77

Guo-Ving X., Sun G., Shun, Y. (2003). Oxidative stress from fluoride induced hepatotoxicity in rats. *Fluoride.* 36: 25-29.



Hassan H.A., Yousef M.I. (2009). Mitigating effects of antioxidant properties of black berry juice on sodium fluoride

induced hepatotoxicity and oxidative stress in rats. *Food Chem. Toxicol.* 47: 2332-2337.

Hassan H.A., Abdel-Aziz A.F. (2010). Evaluation of free radical-scavenging and anti-oxidant properties of black berry against fluoride toxicity in rats. *Food Chem. Toxicol.* 48: 1999-2004.

Heidenreich O., Neiningger A., Schrott G., Zinck R., Cahill M.A., Engel K. (1999). MAPKAP kinase 2 phosphorylates serum response factor *in vitro* and *in vivo*. *J. Biol. Chem.* 274 (20):14434-14443.

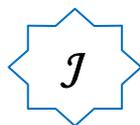
Hodge H.C., Smith F. (1981). Fluoride. Disorders of mineral metabolism. Academic Press. 1: 440-472.

Hould R. (1984). Techniques d'histopathologie et de cytopathologie. Edition Maloine. 19-21: 225-7.



Ibrahim A.A., Raafat N., Ibrahim N.A. (2013). Protective effect of curcumin against toxic effects of sodium fluoride on lungs of adult male albino rats. *British J. Sci.* 9 (1): 29-39.

Itano M.M.D. (1978). Cap serum iron survey. (70): 516-522.



Jacpuot R. (1964). Nutrition animale : Données générales sur la nutrition et l'alimentation. Edition J.B. Baillière et fils Paris. PP : 2127-2132.

Jacyszyn K., Marut A. (1986). Fluoride in blood and urine in humans administered fluoride and exposed to fluoride-polluted air. Fluoride. 19: 26-32.

Jadeja R.N., Thounaojam M.C., Patel D.K., Devkar R.V., Ramachandran A.V. (2014). Pomegranate (*Punica granatum* L.) juice supplementation attenuates isoproterenol-induced cardiac necrosis in rats. Cardiovasc. Toxicol. 10:174-180.

Jadon A., Bhadauria M., Shukla S. (2007). Protective effect of *Terminalia belerica* Roxb. and gallic acid against carbon tetrachloride induced damage in albino rats. J. Ethnopharmacol. 109: 214-218.

Jing S., Yun-zi L., Yin-hui D., Jin W., Ji G., HuanY., Jie R., Jin-yan T., Jing G. (2014). Neuroprotective effects of gallic acid against hypoxia/reoxygenation-

induced mitochondrial dysfunctions *in vitro* and cerebral ischemia/reperfusion injury *in vivo*. Brain Res. 1589: 126-139.

John P. Cooke M.D., Victor J. Dzau, M.D. (1997). Nitric oxide synthase: Role in the Genesis of Vascular Disease. Annu. Rev. Med. 48: 489-509.

Johnson F., Giulivi C. (2005). Superoxide dismutases and their impact upon human health. Mol. Aspects. Med. 26:340-352.

Jollow D.J., Mitchel J.R., Zampaglione Z., Gillette J.R. (1974). Bromobenzene induced liver necrosis. Protective role of glutathione and evidence for 3, 4-bromobenzene oxide as the hepatotoxic metabolites. Pharmacology. 11: 51-57.

Julkunen Titto R. (1985). Phenolics constituents in the leaves of northern willows: Methods for the analysis of certain phenolics. J. Arg. Food Chem. 33: 213-217.



Kaczor J.J., Ziolkowski W., Popinigis J., Tarnopolsky M. (2005). Anaerobic and aerobic enzyme activities in human

skeletal muscle from children and adults. *Pediatr. Res.* 57, 331–335.

Kanbur M., Eraslan G., Silici S., Karabacak M. (2009). Effects of sodium fluoride exposure on some biochemical parameters in mice: Evaluation of the ameliorative effect of royal jelly applications on these parameters. *Food Chem. Toxicol.* 47: 1184-1189.

Kant V., Srisvastave A.K., Verma P.K., Raina R. (2009). Alteration in biochemical parameters during subacute toxicity of fluoride alone and in conjunction with aluminium sulfate in goats. *Biol. Trace Elem. Res.* 130: 20-30.

Kaplan L.A. (1984_a). Glucose. *Clin chem.* The C.V. mosby Co. Si lous.Tronto. Princeton. 1032-1036.

Kaplan A. et al. (1984_b). Bilirubin. *Clin Chem.* The C.V. mosby Co. Si lous.Tronto. Princeton. 1238-1241.

Kaplan A. et al. (1984_c). Tryglycerids. *Clin Chem* the C.V. Mosby co. St Louis. Toronto. Princeton. 437 and lipids. 1194-1206.

Kaplan A. et al. (1984_d). Urea. *Clin chem.* The C.V. mosby Co. Si lous.Tronto. Princeton. 1257-1260.

Kaur G., Jabbar A., Athar M.M., Alam S. (2006). *Punica granatum* (pomegranate) flower extract possesses potent antioxidant activity and abrogates Fe-NTA induced hepatotoxicity in mice. *Food Chem. Toxicol.* 44: 984-993.

Kawaii S., Lansky E.P. (2004) Differentiation-promoting activity of pomegranate (*Punica granatum*) fruit extracts in HL-60 human promyeloocytic leukaemia cells. *J. Food Spring.* 7 (1): 13-18.

Kim H.S., Kang S.W., Rhee S.G., Clerche L.B. (2001). Rat lung peroxiredoxins I and II are differentially regulated during development and by hyperoxia. *Am. J. Physiol.* 280: 1212-1217.

Kolodziejczyk L., Put A., Szczecin Grzela P. (2000). Liver morphology and histochemistry in rats resulting from ingestion of sodium selenite and sodium fluoride. *Fluoride.* 33 (1): 6-16.

Korani M.S., Farbood Y., Sarkaki A., Moghaddam H.F., Mansouri M.T. (2014). Protective effects of gallic acid

against chronic cerebral hypoperfusion-induced cognitive deficit and brain oxidative damage in rats. Eur. J. Pharmacol. 733 : 62-67

Khalil A. (2002). Molecular mechanisms of the protective effect of vitamin E against atherosclerosis. Can. J. Physiol. Pharmacol. 32(8): 662-669.

Koji A., Masahiko W., Toshio N. (2008). Regulation of Neuronal Glutathione Synthesis. J. Pharmacol. Sci. 108: 227-238.

Koller A. (1984). Total serum protein. Clin chem the C.V. Mosby Co. St louis. Toronto.Princeton. 1316-1324.

Kratz J.M., Andrighetti-Fröhner C.R., Leal P.C., Nunes R.J., Yunes R.A., (2008). Haemoglobin free ghosts of human erythrocytes. Arch. Biochim. Biophys, 100:119-130.



Lansky E.P., Jiang W., Mo H., Bravo L., Froom P., Harris N.M., Neeman I., Campbell M.J. (2005_a). Possible synergistic prostate cancer suppression by anatomically discrete pomegranate fractions. Inves. New Drug. 23: 11-20.

Lansky E.P., Harison G., Froom P., Jiang W.G. (2005_b) Pomegranate (*Punica granatum*) pure chemicals show possible synergetic inhibition of humain PC-3 prostate cancer cell invasion across matrigel . Invest. New Drug. 23 (4): 379.

Larrosa M., González-Sarríasb A., Yáñez-Gascón M.J., Selma M.V., Azorín-Ortuño M., Totia S., Tomás-Barberán F., Dolara P., Espina J.C. (2010). Anti-inflammatory properties of a pomegranate extract and its metabolite urolithin-A in a colitis rat model and the effect of colon inflammation on phenolic metabolism. J. Nutr. Biochem. 21: 717-725.

Lee J.H., Jung J.Y., Jeong Y.J., Park J.H., Yang K.H., Choi N.K., Kim S.H., Kim W.J. (2008). Involvement of both mitochondrial- and death receptor-dependent apoptotic pathways regulated by Bcl-2 family in sodium fluoride-induced apoptosis of the human gingival fibroblasts. Toxicology. 243:340–347.

Levine R.L. (2002). Carbonyl modified proteins in cellular regulation; aging and disease. Free. radic. Biol. Med. 32: 790-796.



Li Y., Guo C., Yang J., Wei J., Xu J., Cheng S. (2006). Evaluation of antioxidant properties of pomegranate peel extractin comparison with pomegranate pulp extract. *Food Chem.* 96: 254-260.

Li N., Shi J., Wang K. (2014). Profile and antioxidant activity of phenolic extracts from 10 crabapples (*Malus Wild Species*). *J. Agric. Food Chem.* 62 (3) : 574-581.

Lim T.K. (2013). *Punica granatum*. Edible medicinal and non-medicinal plants. *Springer Fruits.* 5:136-194.

Liu G., Chai C., Cui L. (2003). Fluoride causing abnormally elevated serum nitric oxide levels in chicks. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 13: 199-204.

Loren D.J., Seeram N.P., Schulman R.N., Holtzman D.M. (2005). Maternal dietary supplementation with pomegranate juice is neuroprotective in an animal model of neonatal hypoxic-ischemia brain injury. *Pediatr. Res.* 57 (6): 858-864.

Luis A., Del Rio F. Corpas J., Barroso J.B. (2004). Nitric oxide and nitric oxide synthase activity in plants. *Phytochem.* 65: 783-792.

Machalinski B., Zejmo M., Stecewicz I., Machalinska Z., Machoy Z., Ratajczak M.Z. (2000). The influence of sodium fluoride on the clonogenicity of human hematopoietic progenitor cells: preliminary report. *Fluoride.* 33:168-173.

Malloy H.T. (1937). The determination of bilirubin with the photoelectric colorimeter. *J. Biol. Chem.* 112 (2): 481-491.

Manach C., Scalbert A., Morand C., Rémésy C., Jiménez L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* 79:727-747.

Mansouri M.T., Farbood Y., M.J. Sameri , Sarkaki A. , Naghizadeh B., Rafeirad M. (2013). Neuroprotective effects of oral gallic acid against oxidative stress induced by 6-hydroxydopamine in rats. *Food Chem.* 138 : 1028-1033.

Mansourian A., Boojarpour N., Ashnagar S., Momen Beitollahi J., Shamshiri A.R. (2014). The comparative study of antifungal activity of *Syzygium*

aromaticum, *Punica granatum* and nystatin on *Candida albicans*; An in vitro study. *J. Mycol. Méd.* 24 :163-168.

Martini M.C. , Seiller S. (2006). Actifs et additifs en cosmétologie. Lavoisier 3^{ème} édition Tec et Doc .Paris. PP : 656-661.

Matés J.M., Perez-Gomez C., Nunez De Castro I. (1999). Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem.* 32(8): 595-603.

Matthaiou C.M., Goutzourelas N., Stagos D., Sarafoglou E., Jamurtas A., Koulocheri S.D., Haroutounian S.A., Tsatsakis A.M., Kouretas D. (2014). Pomegranate juice consumption increases GSH levels and reduces lipid and protein oxidation in human blood. *Food Chem. Toxicol.* 73: 1-6.

McCord J.M., Edeas M.A. (2005). SOD, oxidative stress and human pathologies: a brief history and a future vision. *Biomed Pharmacother.* 59: 139-142.

Meiattini F et al. (1978). The 4 hydroxybenzoate / 4-aminophenazone Chromogenic System. *Clin. Chem.* 24 (12): 2161-2165.

Menoyo I., Rigalli A., Puche R.C. (2005). Effect of fluoride on the secretion of insulin in the rat, *Arznei-mittel forschung. Drug Res.* 55: 455-460.

Mittal M., Flora S.J.S. (2006). Effects of individual and combined exposure to sodium arsenite and sodium fluoride on tissue oxidative stress, arsenic and fluoride levels in male mice. *Chem-Biol. Interact.* 162: 128-139.

Montagnier L., Olivier R., Pasquier C. (1998). Oxidative stress in cancer, AIDS and neurodegenerative diseases. Marcel Dekker. New York. PP :247-250.

More D., White J. (2005). Encyclopédie des arbres (plus de 1800 espèces et variétés du monde). Edition Flammarion. Grande Bretagne. P: 256.

Mphahlele R. R. , Stander M. A., Fawole O. A., Opara U. L. (2014). Effect of fruit maturity and growing location on the post harvest contents of flavonoids, phenolic acids, vitamin C and antioxidant activity of pomegranate juice. *Sci. Horticult.* 179 : 36-45.

Murphy K.N., Reddy V.K., Veigas J.M., Murthy U.D. (2004) Study on wound

healing activity of *Punica granatum* peel. J. Med. Food Summer. 7(2): 256-259.

Murray R. (1984_a). Alanine aminotransferase. Clin chem. The C.V. Mosby Co. Si louis. Tronto. Princeton. 1088-1090.

Murray R. (1984_b). Aspartate aminotransferase. Kaplan A et al .Clin chem. The C.V. Mosby Co. Si louis. Tronto. Princeton. 1112-116.

Murray R. (1984_c). Creatinine. Clin chem. The C.V. Mosby Co. Si louis. Tronto. Princeton. 1261-1266.

Mysliwiec Z., Machoy-Mokrzynska A., Juzyszyn Z., Czerny B., Szczecin A.P. (2002). Effects of selenium on serum lipids and enzyme activities in fluoride-intoxicated rats. Fluoride. 35 (3): 168-175.

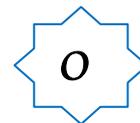


Nabavi S.F., S Nabavi S.M., Habtemariam S., Moghaddam A.H., Sureda A., Mahtab Jafari M., Latifi A.M. Hepatoprotective effect of gallic acid isolated from *Peltiphyllum peltatum* against sodium fluoride-induced

oxidative stress. Ind. Crop. Prod. 44 : 50-55.

Nebert D.W. , Vasiliou V. (2004). Analysis of the glutathione S-transferase (GST) gene family human G 460 Enomics. 1(6) : 460-464.

Neurath A.R., Strick N., Li Y.Y., Debnath A.K.(2004). *Punica granatum* (Pomegranate) juice provides an HIV-1 entry inhibitor and candidate topical microbicide. BMC Infec. Dis. 4:41-47.



O.M.S. Genève (1997). Aspect sanitaires et nutritionnels des oligoéléments et des éléments en traces.

Ossipov V, Salminen JP, Ossipova S, Haukioja E, Pihlaja K . (2003). Gallic acid and hydrolysable tannins are formed in birch leaves from an intermediate compound of the shikimate pathway. Biochem Sys. Ecol. 31: 3-16.

Ozawa T., Lilley T.H., Haslam E. (1987) Polyphenol interactions: astringency and the loss of astringency in ripening fruit. Photochemistry. 26: 2937-2942.



- Panneerselvam L., Subbiah K., Arumugam A., Senapathy G.J.** (2013). Ferulic acid modulates fluoride-induced oxidative hepatotoxicity in male wistar rats. *Biol. Trace Elem. Res.* 151:85-91.
- Parmar H.S., Kar A.** (2007). Protective role of *Citrus sinensis*, *Musa paradisiaca*, and *Punica granatum* peels against diet-induced atherosclerosis and thyroid dysfunctions in rats. *Nutr. Res.* 27: 710-18.
- Patel A.N., Bandawan D.D., Mhetre N.K.** (2014). Pomegranate (*Punica granatum* Linn.) leaves attenuate disturbed glucose homeostasis and hyperglycemia mediated hyperlipidemia and oxidative stress in streptozotocin induced diabetic rats. *Eur. J. Integrative Med.* 6 : 307-321.
- Pesce A.** (1984). Lactate dehydrogenase. *Clin Chem the C.V. Mosby co. St Louis. Toronto. Princeton.* 1124-117,438.
- Pincemail J., Defraigne J.O., Meurisse M., Limet R.** (1996). Antioxydants et prévention des maladies cardiovasculaires 2^{ème} partie : la vitamine E. *Medi. Sphère.* P : 90.
- Pincemail J., Bonjeau K., Cayeux K. Defraigne J.O.** (2002). Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante. *Nutr. Clin. Métabol.* 16 :233-239.
- Polewski K., Kniat S., Slawinska D.** (2002). Gallic acid, a natural antioxidant, in aqueous and micellar environment: spectroscopic studies. *Curr. Top. Biophysics.* 26 : 217-227.
- Prasad L., Khan T.H., Jahangir T., Sultana S.** (2006). Effect of gallic acid on renal biochemical alterations in male wistar rats induced by ferric nitriloacetic acid. *Hum. Exp. Toxicol.* 25 (09):523-529.
- Pratap Reddy K., Sailaja G., Chirumari K.** (2009). Protective effects of selenium on fluoride induced alterations in certain enzymes in brain of mice. *J. Environ. Biol.* 30: 859-864.
- Punithavathi V.P., Ponnian Stanely Mainzen Prince P.S.M., Kumar R., Selvakumari J.** (2011). Antihyperglycaemic, anti lipid peroxidative and antioxidant effects of gallic acid on streptozotocin induced diabetic Wistar rats. *Eur. J. Pharmacol.* 650 : 465-471.



Qujeq D., Laghaie B., Gholipour A., Solimani N., Hassenzadeh S. (2002). Effects of sodium fluoride on total serum protein levels and transaminase activity in rats. *Biomed. Pharmacol.* 56: 169-172.



Ramade F. (2000). *Encyclopédie des pollutions.* Edition Science International. Paris. PP : 198 et 199.

Rathod N.R., Biswas D., Chitme H.R., Ratna S., Muchandi I.S., Chandra R. (2012). Anti-urolithiatic effects of *Punica granatum* in male rats. *J. Ethnopharmacol.* 140 : 234-238.

Reichel F.X., Perraud A., Krahé A. (2004). *Guide pratique de toxicologie.* Edition De Boeck. Paris. PP : 140-143.

Ri-An Y., Tao X., Ai-Guo W., Xue-Min C. (2006). Effects of selenium and zinc on renal oxidative stress and apoptosis induced by fluoride in rats. *Biomed Environ Sci,* 19 : 439-444.

Rosalki S. et al. (1993) *Clin. Chem.* 39 (4) : 648-652.

Rosenblat M., Hayek T., Aviram M. (2006). Anti-oxidative effects of pomegranate juice (PJ) consumption by diabetic patients on serum and on macrophages. *Atherosclerosis.* 187 (2): 363-371.

Roskey F.L. (1965). *Clin Chem.* 11: 478-487.



Schulz J.B., Lindenau J., Seyfried J., Dichgans J. (2000). Glutathione, oxidative stress and neuro-degeneration. *Eur. J. Biochem.* 267 (16) : 4904-4911.

Schwarz k., Milne D.B. (1972). Fluorine requirement for growth in rat. *Bioinorganic Chem.* 1: 331-338.

Seeram, N.P., Adams, L.S., Henning, S.M., Niu, Y., Zhang, Y., Nair, M.G., Heber, D. (2005). *In vitro* antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of punicalagin, ellagic acid and a total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polyphenols as found in pomegranate juice. *J. Nutr. Biochem,* 16 : 360–367.

Shabir A.R., Sarumathi A., Anbu S., Saravanan N. (2013). Gallic acid protects

against immobilization stress-induced changes in wistar rats. *J. Stress Physiol. Biochem.* 9 (1) : 137-147.

Shafik N.M., El Batsh, M.M. (2015). Protective effects of combined selenium and punica granatum treatment on some inflammatory and oxidative stress markers in arsenic-induced hepatotoxicity in rats. *Biol. Trace Elem. Res.* Doi 10.1007/s12011-015-0397-1.

Shanthakumari D., Srinivasalu S., Subramanian S. (2004). Effect of fluoride intoxication on lipid peroxidation and antioxidant status in experimental rats. *Toxicology.* 204:214-228.

Sharad V., Amit S., Abha M. (2013). Gallic acid: Molecular rival of cancer. *Environ. Toxicol. Phar.* 35: 473-485.

Shivarajashankara Y.M., Shivashankara A.R., Rao S..H. (2001). Oxidative stress in children with endemic skeletal fluorosis. *Fluoride.* 34:103-7.

Simons J.E., Yang R.S.H Berman, E. (1995). Evaluation of the nephrotoxicity of complex mixtures containing organic metals: advantages and disadvantages of the use of real-world complex mixtures. *Environ. Health. Prespect.* 103: 67-71.

Singh, J., Rai, G.K., Upadhyay, A.K., Kumar, R., Singh, K.P. (2004). Antioxidant phytochemicals in tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Ind. J. Agric. Sci.* 74: 3-5.

Sireli M., Bülbül A. (2004). The effect of acute fluoride poisoning on nitric oxide and methemoglobin formation in the Guinea pig. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 28: 591-595.

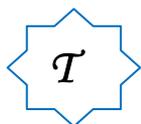
Stanely Mainzen Prince P., Priscilla H., Devika P.T. (2009). Gallic acid prevents lysosomal damage in isoproterenol induced cardiotoxicity in Wistar rats. *Eur. J. Pharmacol.* 139 : 139-143.

Stern J., Lewis W.H.P. (1957). *Clin. Chim. Acta.* 2, 576.

Susheela A.K. (2001). Treatise on fluorosis. Fluorosis Research and Rural Development Foundation. India. PP: 2-30.

Swain S.D., Rohn T.T., Quinn M.T. (2002). Neutrophil priming in host defense: role of oxidants as priming agents. *Antioxid. Redox. Signal.* 4: 69-83.

Szablocs N. (2004). Separation strategies of plants constitutants current status. *J. Chromatogr.* 14 : 35-51.



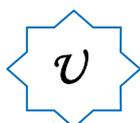
Tabacoo A. et al. (1979). Clin Chem. 25: 336-337.

Tezcan F., Uzascı S., Uyar G., Oztekin N., Erim F.B.(2013). Determination of amino acids in pomegranate juices and fingerprint for adulteration with apple juices. Food Chem. 141 :1187-1191.

Townsend D.M., Tew K.D., Tapiero H. (2003). The importance of glutathione in human disease. Biomed. Pharmacother. 57: 145-155.

Trinder P. (1969). Ann. Clin. biochem. 6: 24-33.

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



UNEP/WHO. (1993). Urban air pollution in Megacities of the world. Geneva: World Health Organization.



Verma R.J., Guna Sherlin D.M. (2002). Sodium fluoride-induced hypoproteinemia and hypoglycemia in parental and F(1)-generation rats and amelioration by vitamins. Food Chem. Toxicol. 40: 1781-1788.

Vijaya Padma V., Sowmya P., Arun Felix T., Baskaran R., Poornima P. (2011). Protective effect of gallic acid against lindane induced toxicity in experimental rats. Food Chem. Toxicol. 49 : 991-998

Viola A., Botta A. (2005). Toxicologie. 2^{ème} édition Tec et Doc. Édition Médicales Internationales. Lavoisier. Paris PP : 224-226.



Webster D. (1974). Clin Chem. Acta. 53 : 109-115.

Wenger C. et al. (1984). Alkaline phosphatase. Clin. Chem. The C.V. Mosbey Co. St Louis. Toronto. Princeton. 1094-1098.

Wolfe K., Wu X., Liu R.V.(2003). Antioxidant activity of apple peels. *J. Agr. Argic. Food Chem.* 51: 609-14.

Wu Guoyao, Fang Yun-Zhong, Yang Sheng, Lupton Joanne R., Turner Nancy D. (2003). Glutathione metabolism and its implications for health. *J. Nutr.* 489-492.



Yen G.L, Chen H.Y. (1995). Antioxidant activity of various tea extract in relation to their antimutagenicity. *J. Agric. Food Chem.* 43:27-32.

You B.R., Hyun W., Park A. (2010). Gallic acid-induced lung cancer cell death is related to glutathione depletion as well as reactive oxygen species increase. *Toxicol in vitro.* 24: 1356-1362.



Zhang Y., Ji R.D. (1996). Progress of study on free radical mechanism of fluorosis in China. *Chin. J. Hygiene Res.* 4: 217-221.

Zhen M., Lihong S., Yunyun C. (2005). Effect of pomegranate leaf tannins on

hyperlipidemic models. *Chinese J. Exper. Traditional Medic. Formulae.* 11(1): 22-24.

Zhishen, J., Mengcheng, T., Jianming, W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem.* 64: 555-559.