

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث 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

En vue de l'obtention du diplôme de DOCTORAT 3^{ème} cycle LMD
En Biochimie
Option : Biochimie appliquée

Étude des effets protecteurs de la supplémentation en
sélénium et en zinc sur la cytotoxicité induite par le
méthidathion chez le rat wistar : Exploration
thérapeutique de l'extrait aqueux d'*Artemisia campestris*

Présentée par : M^{elle} BARKAT Leila

Directeur de thèse : M. MESSARAH Mahfoud

Professeur, Université d'Annaba

Membres de Jury:

Président : M. ABDENNOUR Cherif

Professeur, Université d'Annaba

Examineurs : M. KECHRID Zine

Professeur, Université d'Annaba

M. CHEFROUR Azzedine

Professeur, Université de Souk Ahras

Année universitaire : 2015-2016

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

A decorative flourish consisting of symmetrical, swirling lines that extend horizontally from the base of the Basmala text.

Dédicaces

Toutes les lettres ne sauraient trouver les mots qu'il faut...

Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude,

L'amour, Le respect, la reconnaissance...

Aussi, c'est tout simplement que



Je dédie cette

Thèse... ✍

A LA MEMOIRE DE MON TRES CHER PERE

BARKAT FAISSAL

الله يرحمك

Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour toi.

Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être.

Ce travail est le fruit de tes sacrifices que tu as consentis pour mon éducation et ma formation,

Tu a attendu ce moment avec impatience mais malheureusement tu na pas y assisté, papa tu ma fait aimer les études à travers ton amour pour la science et la médecine,

Tu ma soutenu jusqu'aux derniers instants de ta vie et tu a tout fait pour me pousser à avancer. Me voila aujourd'hui je réalise ton rêve... Qu'ALLAH vous accueille dans son éternel paradis..

A MA TRES CHERE MERE NADJIA

Affable, honorable, aimable : Tu représentes pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi.

Ta prière et ta bénédiction m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études. Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que tu mérites pour tous les sacrifices que tu n'as cessé de me donner depuis ma naissance, durant mon enfance et même à l'âge adulte.

Tu as fait plus qu'une mère puisse faire pour que ses enfants suivent le bon chemin dans leur vie et leurs études. Je te dédie ce travail en témoignage de mon profond amour. Puisse Dieu, le tout puissant, te préserver et t'accorder santé, longue vie et bonheur.

A MES TRES CHERES SCEURS

Amira, Ines et Sabrina

En souvenir d'une enfance dont nous avons partagé les meilleurs et les plus agréables moments,

Pour toute la complicité et l'entente qui nous unissent,

Pour toute l'ambiance dont vous m'avez entouré, pour toute la spontanéité et votre élan chaleureux,

Ce travail est un témoignage de mon attachement et de mon amour,

Je vous souhaite un avenir plein de joie, de bonheur, de réussite et de sérénité.

A LA MEMOIRE DE MON GRAND PERE PATERNEL

Qui a été toujours dans mon esprit et dans mon cœur,

Je vous dédie aujourd'hui ma réussite.

Qu'ALLAH vous accueille dans son éternel paradis

A MES CHERS GRANDS PARENTS MATERNELS

MA CHERE GRANDE-MERE PATERNELLE

Que ce modeste travail, soit l'expression des vœux que vous n'avez cessé de formuler dans vos prières.

Que Dieu vous préserve santé et longue vie..

A MES CHERS COLLEGUES DE LA FACULTE DE MEDECINE ANNABA

Dr. Ayad wahid, Dr. Bourenane Naziha, Dr. Mansouri Warda,
Dr. Aylan Nawel

***SANS OUBLIE TOUS LES ENSEIGNANTS QUI ONT CONTRIBUE A MA FORMATION TOUS
CYCLES CONFONDUES, JE LE SERAI ETERNELLEMENT RECONNAISSANTE.***

Remerciements

Avant tous mes plus sincères remerciements à Allah le tout puissant, de m'avoir donné la force et la patience pour réaliser cet humble travail.

Je suis très reconnaissante d'adresser mes très sincères remerciements envers Monsieur le Professeur Mahfoud MESSARAH. Professeur au département de Biochimie et directeur du laboratoire de biochimie et toxicologie environnemental-Université de Annaba qui a accepté de diriger ce travail. Vous m'avez fait confiance et vous m'avez permis d'avancer par vos conseils et votre aide afin de pouvoir clôturer à bien cette thèse. Je vous remercie d'avoir apporté votre expérience et d'avoir passé de nombreux moments à la correction de ce manuscrit et des publications. Votre compétence, rigueur scientifique et clairvoyance m'ont beaucoup appris. Ils ont été et resteront des moteurs de mon travail dans la recherche. Eternelle reconnaissance.

Mes vifs remerciements s'adressent également à :

Monsieur le professeur Cherif ABDENNOUR de l'Université de Annaba pour le grand honneur qu'il nous a fait en acceptant de présider le jury de ma soutenance de thèse de doctorat. Qu'il trouve dans ce présent travail, l'expression de ma considération respectueuse.

Monsieur le Professeur Zine KECHRID de l'Université de Annaba pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse et d'examiner ce travail. J'ai toujours admiré son dévouement et sa compétence

Monsieur le Professeur Azzedine CHEFROUR de l'Université de Souk Ahras pour avoir accepté d'examiner ce travail et pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire de Botanique et de m'avoir permis de travailler dans d'aussi bonnes conditions.

J'ai eu la chance et aussi le plaisir d'effectuer une partie de ce travail de recherche dans le laboratoire de développement chimique, galénique et pharmacologique des médicaments (CGPM), faculté de pharmacie Monastir Tunisie dirigé par le professeur M^{me} Zohra MARZOUK. Je tiens à lui exprimer mes sincères remerciements pour m'avoir permis de réaliser mon stage pour l'identification ainsi que le dosage biochimique de la plante *Artemisia campestris* dans de meilleures conditions tout en me laissant une grande liberté, pour son soutien et sa grande générosité. J'aimerais également adresser ma reconnaissance à l'ensemble des membres du laboratoire CGPM surtout docteur Assia HAMDI qui m'ont aidé à atteindre le but de mes déplacements.

Je remercie sincèrement monsieur Ali LADJAMA Professeur à l'université Badji Mokhtar d'Annaba, de m'avoir permis de réaliser mon travail au sein de son laboratoire « biochimie et microbiologie appliquée ».

Je tiens aussi à remercier Monsieur Lazher TICHATI, Ingénieur au laboratoire L.B.M.A., Université Badji Mokhtar, Annaba, qui m'a guidé tout au long de ce travail au laboratoire de biochimie. Recevez ici l'expression de ma profonde gratitude.

Je voudrais également remercier le Personnel du service cytogénétique Hôpital IBN ROCHD Annaba, ainsi que le personnel du service d'anatomie pathologique: un Merci particulier au docteur Omar LAOUAR et docteur Ahmed BOUSSOUFA médecins spécialiste en Anatomie-pathologie pour la réalisation et l'interprétation des coupes histologiques.

Très humblement, je voudrais remercier chaleureusement monsieur Hssen BOUHADJA. Professeur au département des mines-Université d'Annaba, pour son accueil chaleureux à chaque fois que j'ai sollicité son aide, ainsi que pour ses multiples encouragements notamment lors de la pré-soutenance.

Je remercie également monsieur Moussa, ainsi que tout les membres du département des mines-Université d'Annaba, pour la bonne humeur et leurs encouragements pendant la phase finale de ce travail.

En ce qui concerne la partie informatique de ce travail, j'exprime ma profonde gratitude à Mr. Réda SEPTI, responsable de l'entreprise informatique XEROX, pour son amical accueil, ses conseils ainsi que pour la gentillesse et la patience qu'il a manifesté à mon égard.

Un grand merci à tous les thésards et surtout à mes anciens et actuels collègues : Ihçène, Asma, Amel, Fahima, Lilia, Mouna, Khalil et Safa

Ces remerciements ne seraient pas complets sans associer toutes les personnes ayant contribué, de près ou de loin, à la réalisation de ce travail.

Soyons reconnaissants aux personnes qui nous donnent
du bonheur ; elles sont les charmants jardiniers
par qui nos âmes sont fleuries.

Leila



Table des matières

TABLE DES MATIERES

RESUME

ACTIVITE SCIENTIFIQUE

ABREVIATIONS

LISTE DES TABLEAUX

LISTE DES FIGURES

INTRODUCTION

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I. INSECTICIDES ORGANOPHOSPHORES

1. Pesticides.....	1
1.1.Définition	1
1.2.Classification des pesticides et mode d'action.....	1
1.2.1. Classification selon les espèces nuisibles.....	1
1.2.2. Classification selon la famille chimique.....	2
1.3.Insecticides organophosphorés.....	3
1.4.Définition.....	3
1.5. Nature chimique des insecticides organophosphorés.....	4
1.6. Mécanisme d'action des insecticides organophosphorés.....	4
1.7. Métabolisme des insecticides organophosphorés.....	6
1.8.Toxicité des insecticides organophosphorés.....	6
1.8.1. Intoxication aiguë.....	6
1.8.2. Intoxication chronique.....	7
2. Insecticide organophosphoré (le Méthidathion).....	7
2.1.Propriétés physico-chimiques.....	7
2.2.Utilisation.....	8
2.3.Devenir dans l'environnement.....	8
2.4.Mode d'action et biotransformation de Méthidathion.....	8
2.4.1. Mode d'action.....	8
2.4.2. Biotransformation.....	8
2.4.3. Toxicité de Méthidathion.....	10
3. Toxicité pour certains organes.....	11

CHAPITRE II. STRESS OXYDATIF

1. Stress oxydatif.....	12
1.1.Définition.....	12
1.2.Radicaux libres.....	12
1.3. Espèces réactive de l'oxygène.....	12
1.3.1. Définition des espèces réactives de l'oxygène.....	12
1.3.2. Source et production des espèces réactive de l'oxygène.....	13
1.3.2.1.ERO radicalaire.....	13
1.3.2.2.ERO non radicalaire.....	15
1.4.Conséquences moléculaires du stress oxydant.....	16
1.4.1. Oxydation des lipides.....	16
1.4.2. Oxydation des protéines.....	17
1.4.3. Oxydation des acides nucléiques.....	18

1.5. Maladies liées au stress oxydant.....	18
1.6. Mécanisme de défense antioxydants.....	19
1.6.1. Système de défense enzymatique.....	19
1.6.1.1. Les superoxydes dismutases.....	19
1.6.1.2. Catalase (CAT).....	20
1.6.1.3. Glutathion peroxydase (GSH-Px).....	20
1.6.1.4. Glutathion réductase.....	21
1.6.1.5. Glutathion-S-transférase.....	21
1.6.2. Système antioxydant non enzymatique.....	21
1.6.2.1. Antioxydant hydrosoluble.....	21
1.6.2.2. Antioxydant liposolubles.....	22
1.6.2.3. Oligoéléments.....	23

CHAPITRE III. OLIGOTHERAPIE SELENIUM ZINC

1. Sélénium	24
1.1. Définition.....	24
1.2. Propriétés physico-chimiques.....	24
1.3. Source et utilisations.....	25
1.3.1. Source.....	25
1.3.2. Utilisation.....	26
1.4. Métabolisme du sélénium.....	26
1.4.1. Absorption.....	26
1.4.2. Distribution.....	26
1.4.3. Excrétion.....	27
1.5. Rôle physiologique.....	27
1.6. Carence en sélénium.....	29
1.7. Toxicité du sélénium.....	29
2. Zinc.....	29
2.1. Définition.....	29
2.2. Propriétés physico-chimiques.....	30
2.3. Source et utilisation.....	30
2.4. Métabolisme du zinc.....	31
2.5. Rôle physiologique.....	32
2.6. Carence du zinc.....	34
2.7. Toxicité du zinc.....	34

CHAPITRE IV. PHYTOTHERAPIE

1. Généralités sur la phytothérapie.....	35
1.1. Utilisation des plantes médicinales.....	35
1.2. Métabolites secondaires des plantes.....	35
1.2.1. Composés aromatiques (polyphénols).....	36
1.2.2. Terpènes.....	38
1.2.3. Huiles essentielles.....	38
2. Artemisia campestris.....	38
2.1. Habitat et présentation de la plante.....	39
2.2. Systématique botanique.....	39
2.3. Composition chimique.....	40
2.4. Propriétés thérapeutiques.....	40
2.5. Activités biologiques.....	41
2.5.1. Activité antioxydante.....	41
2.5.2. Activité hypoglycémiante.....	41

2.5.3. Activité antibactérienne.....	41
--------------------------------------	----

ETUDE EXPERIMENTALE

CHAPITRE I. MATERIELS ET METHODES

1. Etude phytochimique.....	42
1.1. Matériel végétal.....	42
1.2. Préparation de l'extrait aqueux d' <i>Artemisia campestris</i>	42
1.3. Screening des composés phénolique d' <i>Artemisia campestris</i>	42
1.3.1. Mise en évidence des flavonoïdes.....	42
1.3.2. Mise en évidence des tanins.....	42
1.3.3. Mise en évidence des stérols et terpènes.....	42
1.3.4. Mise en évidence des cardénolides.....	42
1.3.5. Mise en évidence des saponosides.....	43
1.4. Détermination quantitative des composés phénolique d' <i>Artemisia campestris</i>	43
1.4.1. Dosage des polyphénols totaux.....	43
1.4.2. Dosage des flavonoïdes totaux.....	44
1.4.3. Dosage des tanins condensés.....	45
1.5. Evaluation de l'activité antiradicalaire.....	45
1.5.1. Test de DPPH.....	45
1.5.2. Test de l'ABTS.....	46
1.6. Extraction des huiles essentielles.....	47
2. Matériel biologique.....	48
2.1. Traitement des rats.....	48
2.1.1. Expérimentation 1.....	48
2.1.2. Expérimentation 2.....	49
2.2. Sacrifice des rats et prélèvement des échantillons.....	49
2.2.1. Prélèvement sanguin.....	49
2.2.2. Prélèvements des organes.....	50
3. Techniques de dosages.....	53
3.1. Détermination de la formule de numération sanguine (FNS).....	53
3.2. Dosage des paramètres biochimiques.....	53
3.2.1. Dosage de glucose.....	53
3.2.2. Dosage de la bilirubine totale ou directe.....	54
3.2.3. Dosage du cholestérol.....	55
3.2.4. Dosage des triglycérides.....	56
3.2.5. Détermination de l'activité alanine aminotransférases (ALAT/TGP).....	57
3.2.6. Détermination de l'activité aspartate aminotransférase (ASAT/TGO).....	58
3.2.7. Détermination de l'activité lactate déshydrogénase (LDH).....	58
3.2.8. Détermination de l'activité phosphatase alcaline (PAL).....	59
3.2.9. Dosage de la créatinine plasmatique.....	60
3.2.10. Dosage de l'urée.....	60
3.2.11. Dosage du Fer.....	61
3.3. Exploration de la fonction thyroïdienne et testiculaire.....	62
3.4. Dosage des paramètres du stress oxydatif.....	62
3.4.1. Préparation de l'homogénat.....	62
3.4.2. Dosage des protéines.....	62
3.4.3. Détermination du taux de malondialdéhyde (MDA).....	63
3.4.4. Détermination du taux du glutathion réduit (GSH).....	64

3.4.5. Détermination de l'activité enzymatique de la glutathion peroxydase (GPx)	65
3.4.6. Détermination de l'activité enzymatique de la glutathion-S-transférase (GST)	66
3.4.7. Détermination de l'activité enzymatique de la catalase.....	67
3.4.8. Détermination de l'activité enzymatique de la superoxydedismutase (SOD)	68
3.4.9. Détermination de l'activité de l'acétylcholinestérase (AChE)	69
4. Etude histologique.....	69
5. Traitement statistique des résultats.....	71

CHAPITRE II. RESULTAT

RESULTATS DE LA PREMIERE EXPERIMENTATION

1. Etude pondéral.....	72
1.1. Variation du poids corporel.....	72
1.2. Variation de la consommation quotidienne d'aliment.....	72
1.3. Variation de la consommation quotidienne d'eau de boisson.....	72
1.4. Variation du poids relatif de certains organes.....	72
2. Variation des paramètres hématologiques.....	75
2.1 Nombre de globules rouges.....	75
2.1. Taux d'hémoglobine (Hb) et taux des plaquettes (Pt)	75
2.2. Volume globulaire moyen (VGM) et concentration corpusculaire moyen en hémoglobine (CCMH)	75
2.3. Taux d'hématocrite et nombre de globule blanc.....	75
3. Effet sur la concentration sérique du fer.....	75
4. Variation des paramètres biochimiques.....	77
4.1. Concentration plasmatique en glucose.....	77
4.2. Concentration plasmatique en bilirubine directe.....	77
4.3. Concentration plasmatique en cholestérol et triglycérides.....	77
4.4. Effet sur l'activité des aminotransaminases.....	77
4.5. Effet sur l'activité de la phosphatase alcaline (PAL)	77
4.6. Effet sur l'activité de lactate déshydrogénase (LDH)	78
4.7. Concentration plasmatique en urée et en créatinine.....	78
5. Etude de quelques paramètres du stress oxydatif.....	80
5.1. Malondialdéhyde (MDA)	80
5.2. Glutathion réduit (GSH)	80
5.3. Les enzymes antioxydantes.....	82
5.3.1. Glutathion peroxydase (GPx)	82
5.3.2. Glutathion - S- transférase (GST)	82
5.3.3. Superoxydedismutase (SOD)	82
5.3.4. Catalase (CAT)	82
6. Effet sur la concentration sérique des hormones thyroïdiennes.....	84
6.1. Triiodothyronine.....	84
6.2. Thyroxine.....	84
7. Effet sur la concentration sérique en testostérone.....	84
8. Impact sur l'histoarchitecture du foie.....	85

RESULTATS DE LA DEUXIEME EXPERIMENTATION

1. Etude phytochimique.....	87
1.1 Screening des composés phénolique d' <i>Artemisia campestris</i>	87

1.2.Teneur en flavonoïdes, en tanins et en polyphénols de l' <i>Artemisia campestris</i>	88
1.3.Activité antioxydante.....	88
1.4.Mise en évidence de l'huile essentielle.....	90
2. Etude biologique.....	91
1.1.Etude pondérale.....	91
1.1.1. Variation du poids corporel.....	91
1.1.2. Variation de la consommation quotidienne d'aliment.....	91
1.1.3. Variation de la consommation quotidienne d'eau de boisson.....	91
1.1.4. Variation du poids relatif de certains organes.....	91
1.2.Variation des paramètres hématologiques.....	93
1.2.1. Nombre de globules rouges.....	93
1.2.2. Taux d'hémoglobine (Hb) et taux de plaquettes (Pt)	93
1.2.3. Volume globulaire moyen (VGM) et concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (CCMH)	94
1.2.4. Taux d'hématocrite et nombre de globules blancs.....	94
1.3.Effet sur la concentration sérique du fer.....	94
1.4.Variation des paramètres biochimiques.....	96
1.4.1. Concentration plasmatique en glucose.....	96
1.4.2. Concentration plasmatique en bilirubine directe.....	96
1.4.3. Concentration plasmatique en cholestérol et triglycérides.....	96
1.4.4. Effet sur l'activité des aminotransaminases.....	96
1.4.5. Effet sur l'activité de la phosphatase alcaline (PAL)	96
1.4.6. Effet sur l'activité du lactate déshydrogénase (LDH)	96
1.4.7. Concentration plasmatique en urée et en créatinine.....	97
1.5.Etude de quelques paramètres du stress oxydatif.....	99
1.5.1. Malondialdéhyde (MDA)	99
1.5.2. Glutathion réduit (GSH)	99
1.5.3. Les enzymes antioxydantes.....	99
1.5.3.1. Glutathion peroxydase (GPx)	99
1.5.3.2. Glutathion - S- transférase (GST)	99
1.5.3.3. Superoxydodismutase (SOD)	101
1.5.3.4. Catalase (CAT)	101
1.6.Effet sur l'activité acétylcholinestérase cérébrale.....	104
1.7.Effet sur l'histoarchitecture des reins.....	104

CHAPITRE III. DISCUSSION

1. Evaluation des effets cytotoxiques de Méthidathion chez les rats Wistar : effet sur la variation des paramètres hématologiques, biochimiques, histopathologiques et sur le statut du stress oxydatif.....	107
2. Evaluation des effets cytoprotecteurs et antioxydants du sélénium et du zinc contre la cytotoxicité induite par le Méthidathion chez les rats Wistar.....	115
3. Evaluation de la capacité préventive de l'extrait aqueux d' <i>Artemisia campestris</i> sur les effets néfastes induits par le Méthidathion chez les rats Wistar.....	118

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVE	123
BIBLIOGRAPHIE	126
ANNEXE	147

Résumé

L'objectif de cette étude est l'évaluation des activités antioxydantes du sélénium et du Zinc ainsi que l'effet préventif de l'extrait aqueux obtenu à partir de l'*Artemisia campestris* (EQAC), plante cultivée à El-Aouinette (wilaya de Tebessa), contre le stress oxydatif induit par le Méthidathion (MD) chez les rats blancs mâles de la souche Wistar.

L'analyse phytochimique de l'extrait aqueux (5g/l) a révélé une richesse de l'*Artemisia campestris* en polyphénols, en flavonoïdes et en tanins mais le contenu en tanins est faible par rapport à celui des polyphénols et des flavonoïdes. Nous montrons que cette plante possède une activité antioxydante et antiradicalaire évaluées *in vitro* par un test DPPH et un test ABTS.

L'étude biologique *in vivo* a été effectuée avec deux expérimentations pendant 28 jours sur 48 rats mâles basées sur l'évaluation des effets cytotoxiques induites par le MD (5mg/Kg PC), dont la première expérimentation concerne l'effet cytoprotecteur du Sélénium (1,5 mg/Kg PC) et du zinc (0.227 g/l), alors que la deuxième expérimentation est focalisée sur l'effet préventive de l'EQAC (5g/l).

Les résultats obtenus, montrent que le MD provoque un effet négatif sur la croissance corporelle, sur les biomarqueurs biochimiques : glucose, bilirubine directe, cholestérol, triglycérides, urée, créatinine, transaminases (ASAT, ALAT), phosphatase alcaline, triiodotyronine (T3) et thyroxine (T4). A noter aussi un trouble sur les biomarqueurs hématologiques (globules rouges, hémoglobine). De plus, l'implication du MD sur le stress oxydatif est confirmée par une diminution du taux de glutathion réduit (GSH) et des activités de quelques enzymes antioxydantes (GPx, GST, SOD et CAT), une augmentation du taux de MDA au niveau des organes étudiés (foie, reins, testicules et cerveau) ainsi qu'un effet négatif sur l'acétylcholinestérase du cerveau. Sur le plan histologique, la microscopie optique révèle une altération du parenchyme hépatique (congestion vasculaire, infiltration mononucléaire, dilatation des sinusoides, hémorragie et nécrose tissulaire) ainsi que du parenchyme rénal (hémorragie, congestion vasculaire, dilatation tubulaire, sclérose de glomérule et nécrose des cellules épithéliales de tube contourné proximal). Cependant, nos résultats révèlent que la supplémentation en sélénium, zinc et en EQAC aux rats traités par le Méthidathion ont améliorée les perturbations des paramètres biochimiques, hématologiques, histologiques ainsi que le statut antioxydant et par conséquence atténué l'intensité du stress oxydatif induit par le MD.

En conclusion, la préparation d'un extrait aqueux d'*Artemisia campestris*, plante à usage médical traditionnel, semble avoir des effets protecteurs antioxydants contre la toxicité induite le MD.

Mots clés : Méthidathion, Sélénium, Zinc, *Artemisia campestris*, Stress oxydatif, Antioxydant, Rat

Abstract

The aim of this investigation is to evaluate the antioxidant effects of both selenium/zinc elements and the preventive effect of the aqueous extract of *Artemisia campestris* (AEAC), plant cultivated at El-Aouinette (Tebessa), against oxidative stress induced by méthidathion (MD) in male albino Wistar rats

A preliminary phytochemical study of AEAC (5g/l) was achieved, initiated by quantitative analysis of phenolic compounds and followed by antiradical tests. The results revealed the presence of a significant rate of polyphenols, flavonoids and tannins, but the rate of tannins was lower than the two other antioxidants, which was confirmed by antiradical test of DPPH and ABTS.

The biological in vivo study was performed with two experiments for 28 days on 48 male rats based on the evaluation of the cytotoxic effects induced by the MD (5mg / kg CP), the first experiment concerns the cytoprotective effect of Selenium (1.5 mg / kg bw) and zinc (0.227 g / l), whereas the second experiment focused on the preventive effect of EQAC (5g/l).

The results showed that the MD causes a negative effect on the body growth, biochemical biomarkers: glucose, direct bilirubin, cholesterol, triglycerides, urea, creatinine, transaminases (AST, ALT), alkaline phosphatase, triiodothyronine (T3) and thyroxine (T4). As well the MD provoked disorder on hematological biomarkers (red blood cells, hemoglobin). Furthermore, the involvement of MD on oxidative stress was confirmed by a decrease in the reduced glutathione (GSH) and of some activities antioxidant enzymes (GPx, GST, SOD and CAT), an increase in MDA levels in studied organs (liver, kidneys, brain and testes) as well a negative effect on brain acetylcholinesterase. Histological, light microscopy revealed impaired hepatic parenchyma (vascular congestion, mononuclear infiltration, dilated sinusoids, hemorrhage and tissue necrosis) and the renal parenchyma (hemorrhage, vascular congestion, tubular dilation, sclerosis of glomeruli and necrosis epithelial cells of the proximal tubule). However, our results indicated that selenium, zinc and AEAC supplementation at rats treated with methidathion have improved disruptions in biochemical parameters, hematological, histological and antioxidant status and consequently reduced the intensity of oxidative stress induced by the MD.

In conclusion, preparing an aqueous extract of *Artemisia campestris*, traditional medical plant, appears to have protective effects antioxidants against the toxicity induced the MD

Key words: méthidathion, selenium, zinc, *Artemisia campestris*, oxidative stress, antioxidant, rats.

الهدف من هذا العمل هو دراسة النشاط المضاد للأكسدة بالنسبة للسيلينيوم والزنك و التأثير الوقائي للنبتة الطبية "دقوفت" التي تزرع في مدينة العوينات (ولاية تبسه) ودور كل منهما في حماية الخلايا من الإجهاد التأكسدي الناتج عن تأثير مبيد الحشرات "المثداثيون" عند جرذان ذكور من سلالة Wistar.

التحليل الفيتوكيميائي للمستخرج المائي (5غ/ل) أثبت أن نبتة *Artemisia campestris* غنية بالبوليفينول، الغلافونويد والدباغ، مع تسجيل كمية منخفضة لهذا الأخير مقارنة بالبوليفينول و الغلافونويد. بينت النتائج من خلال اختبار تثبيط الجذور الحرة DPPH و ABTS أن النبتة الطبية تمتلك نشاطات مضادة للأكسدة.

أجريت دراسة بيولوجية داخلية تمثلت في القيام بتجربتين لمدة 28 يوم مستعملة 48 جرذان ذكور، قامت على أساس التأثير السلبي للمثداثيون (5مغ/كغ و.ج)، حيث تركزت التجربة الأولى على تأثير السيلينيوم (1.5 مع/كغ) والزنك (0.227 غ/ل) في حماية الخلايا في حين ركزت التجربة الثانية على الأثر الوقائي، للدقوفت (5غ/ل).

النتائج المتحصل عليها بينت أن الميثداثيون يحدث تأثيرات سلبية على معدل النمو، كما أحدث اضطرابات بيوكيميائية (الغلوكوز، البيليروبين المباشر، الكولسترول، الدهون الثلاثية، يوريا، كرياتين، ناقلات الأمين ALAT ASAT و فوسفاتاز قاعدي، ثلاثي اليود التيرونيني T3 و التيروكسين T4، كما لوحظ أيضا اضطراب في قيم الصيغة الدموية (الكريات و الهيمغلوبين). تم تأكيد مساهمة الميثداثيون في ظهور الإجهاد التأكسدي و ذلك من خلال انخفاض في قيمة الغلوتاثيون GSH و نشاط مختلف الإنزيمات المضادة للأكسدة (CAT SOD GST GPx) كما يحدث زيادة في قمة MDA. بالإضافة إلى التأثير السلبي على AChE الدماغية. تشرحيًا، أظهرت الدراسة المهجرجية تلف على مستوى الكبد و الكليتين.

بالمقابل أوضحت نتائجنا، أن إضافة السيلينيوم/الزنك و المستخلص المائي للنبتة الطبية "دقوفت" إلى الجرذان المعالجة بالمثداثيون أدت إلى تحسن المؤشرات البيوكيميائية، الدموية وتخفيف السمية الخلوية مما أدى إلى التخفيض من شدة الإجهاد التأكسدي الناتج عن الميثداثيون. نستنتج أن تحضير المستخرج المائي من النبتة الطبية *Artemisia campestris* أوضح تأثيرها الوقائي المضاد للأكسدة ضد التسمم الناتج عن الميثداثيون.

الكلمات الدالة: الميثداثيون، السيلينيوم، الزنك، النبتة الطبية (دقوفت)، الإجهاد التأكسدي، مضاد للأكسدة، جرذان التجارب.



Activités scientifiques

Communications nationales

1. Participation aux journées scientifiques Santé Travail Environnement JSTE . Oran- les Andalouses le 27-28 Novembre 2010. Communication affichée : BOUASLA, I., MONGI, S., AMAMRA, W., MESSARAH, M. « contribution à l'étude de l'effet toxique induit par le diazinon sur la variation de quelques paramètres hématologiques et histopathologiques chez le rat de la souche wistar ».
2. Participation au premier séminaire d'oncologie médicale d'Annaba le 8-9 avril 2011. Communication affichée : BOUASLA, I., MONGI, S., AMAMRA, W., MESSARAH, M. « Altération hépatocytaire et néphrologique induite par un insecticide organophosphoré le diazinon, chez le rat de la souche Wistar.
3. Participation à la 6^{ème} journée de méthodologie en recherche clinique « Maitrise de la clinométrie et bonnes pratiques cliniques ». Annaba le 23 mai 2013. Communication affichée : BARKAT, L., BOUMENDJEL, A., LAOUAR, M., MOUILHI, M., MESSARAH, M.« Evaluation de l'impact cytotoxique du Méthidathion sur la variation de quelques paramètres de croissance, hématologique, biochimique, et sur le taux de MDA chez le rat Wistar ».
4. Participation aux 5^{ème} congrès de biologie médicale et médecine de laboratoire. Alger 18-19 Mai 2015. Communication affichée : BARKAT, L., BOUMENDJEL, A., MONDJI, S.,MESSARAH, M. « Artemisia campestris leaf aqueous extract alleviates methidathion nephrotoxicity in Wistar rats »

Communications internationales

1. Participation au 3^{ème} séminaire international de biologie animale. Constantine le 09-11 mai 2011. Communication affichée : BOUASLA, I., MONGI, S., AMAMRA, W., MESSARAH, M. « Etude des effets cytotoxiques du diazinon sur la variation de quelques paramètres hématologiques chez le rat de la souche Wistar ».
2. Participation au séminaire d'échange international « aux interfaces du développement durable » SEMAGRO TECH. Bejaia le 21 et 22 juin 2011. Communication affichée : BOUASLA, I., MONGI, S., AMAMRA, W., MESSARAH, M. « Etude des effets cytotoxiques du diazinon sur la variation de quelques paramètres biochimique et histopathologique chez le rat de la souche Wistar ».
3. Participation au 3^{ème} congrès international sur les molécules bioactives, Aliments fonctionnels et maladies associées au stress oxydant. Tunisie. Hammamet le 21-23 mars 2014. Communication affichée: BARKAT, L., BOUMENDJEL, A., MESSARAH, M. « protective effects of an aqueous extract of Artemesiacampstris against methidathion induced hepatotoxicity in maleswistars rats ».

Articles scientifiques

- (1) Barkat, L., Boumendjel, A., Mongi, S., EL-Feki, A., Messarah, M. (2015).**
Artemisia campestris Leaf Aqueous Extract Alleviates Methidathion-Induced Nephrotoxicity in Rats. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* 32(2): 200-209.
- (2) Barkat, L., boumendjel, A., abdennour, C., Boulakoud, M.S., Messarah, M. (2015).**
Methidathion-induced hematological, biochemical and hepatohistological alterations in rat: Ameliorative effects of selenium and zinc. *Afr. J. Biotech.* 14(21): 1796-1806.

LISTE DES FIGURES

<u>Figure</u>	<u>Titre</u>	<u>Page</u>
01	Structure chimique générale des organophosphorés	4
02	Hydrolyse de l'acétylcholine par l'AChE au niveau de la synapse cholinergique	5
03	Mécanisme d'inhibition de l'acétylcholinestérase par les organophosphorés	5
04	Structure chimique du Méthidathion	7
05	Voie métabolique de Méthidathion chez les mammifères	10
06	Production des différents radicaux libres oxygénés	13
07	Mode d'action des principaux systèmes enzymatique antioxydants et de leur cofacteurs métallique	19
08	Synthèse de glutathion	21
09	Voie métabolique du sélénium	27
10	Flux corporel du zinc	32
11	Différents types des flavonoïdes à partir du squelette flavane	36
12	Différents composés d'alcaloïdes	38
13	Photo d'Artemisiacampestris station El-Aouinette (Tébessa).	39
14	Courbe d'étalonnage de l'acide gallique (0.2mg/ml).	43
15	Courbe d'étalonnage de la quercétine (0.1mg/ml).	44
16	Courbe d'étalonnage de la catéchine (0.3mg/ml).	45
17	Réaction de réduction de DPPH	45
18	Hydrodistillateur de type Clevenger	47
19	Schéma récapitulatif de la première expérimentation	51
20	Schéma récapitulatif de la deuxième expérimentation	52
21	Gamme d'étalonnage utilisée (BSA 1mg/ml) pour le dosage des protéines.	63
22	Variation de poids corporel PC (g) chez les rats témoins et les rats traités; par le Méthidathion, sélénium et zinc et à la combinaison (Méthidathion/	73

Sélénium+zinc).

23	Variation de la consommation d'aliment et de l'eau de boisson chez les rats témoins et les rats traités; par le Méthidathion, sélénium et zinc et à la combinaison (Méthidathion/ Sélénium+zinc).	74
24	Variation du poids relatif PR (g/100g de poids corporel) des organes (foie, reins et testicules) chez les rats témoins et les rats traités; par le Méthidathion, sélénium et zinc et à la combinaison (Méthidathion/ Sélénium+zinc).	76
25	Variation de la concentration plasmatique en (mg/dl) de glucose, de la bilirubine directe, de cholestérol et des triglycérides chez les rats témoins et les rats traités; par le Méthidathion, sélénium et zinc et à la combinaison (Méthidathion/ Sélénium+zinc)	78
26	Variation de l'activité enzymatique des transaminases, de la phosphatase alcaline et du lactate déshydrogénase (U/L) chez les rats témoins et les rats traités ; par le Méthidathion, sélénium et zinc et à la combinaison (Méthidathion/ Sélénium+zinc	79
27	Variation de la concentration plasmatique en (mg/dl) de l'urée et de la créatinine chez les rats témoins et les rats traités; par le Méthidathion, sélénium et zinc et à la combinaison (Méthidathion/ Sélénium+zinc)	79
28	Variation de MDA (nmol/mg prot) dans les organes (foie, reins, et testicules) chez les rats témoins et les rats traités ; par le Méthidathion, sélénium et zinc et à la combinaison (Méthidathion/ Sélénium+zinc)	81
29	Variation de la teneur cellulaire en Glutathion (nmol/mg prot) dans les organes (foie, reins et testicules) chez les rats témoins et les rats traités ; par le Méthidathion, sélénium et zinc et à la combinaison (Méthidathion/ Sélénium+zinc).	81
30	Coupes histologiques du foie de rat témoin et traités par le sélénium et le zinc colorés à Hématéine-Eosine 100X.CV : Veine centrale	85
31	Coupes histologiques du foie de rat traité par le Méthidathion (5 mg/Kg PC) et par la combinaison Méthidathion+ Sélénium+ zinc colorés à Hématéine-Eosine 100X	86
32	Teneurs en polyphénols, en flavonoïdes et en tanins de l'extrait aqueux	88

d'Artemisiacampestris (EQAC)

33	Activité anti-radicalaire en pourcentage de l'acide ascorbique et des extraits aqueux d'Artemisiacampestris	89
34	Variation de poids corporel (Poids initial et final en g) des rats témoins et traités; par le Méthidathion et l'EQAC et à la combinaison (Méthidathion/EQAC).	92
35	Variation de la consommation d'aliments (g/rats/jrs) et de la consommation d'eau de boisson (ml/rats/jrs) chez les rats témoins et les rats traités; par le Méthidathion et l'EQAC et à la combinaison (Méthidathion/EQAC).	92
36	Variation de poids relatifs des organes : foie, reins et cerveau (g/100 g Pc) chez les rats témoins et les rats traités; par le Méthidathion et l'EQAC et à la combinaison (Méthidathion/EQAC).	93
37	Taux de malondialdéhyde (MDA) (nmol /mg prot) dans les organes (foie, reins et cerveau) chez les rats témoins et les rats traités par le Méthidathion et l'EQAC et à la combinaison (Méthidathion/EQAC).	101
38	Concentration du GSH (nmol /mg prot) dans les organes (foie, reins et cerveau) chez les rats témoins et les rats traités par le Méthidathion et l'EQAC et à la combinaison (Méthidathion/EQAC).	101
39	Variation de l'activité enzymatique Glutathion peroxydase ($\mu\text{mol GSH}/\text{min}/\text{mg prot}$) dans les organes (foie, reins et cerveau) chez les rats témoins et les rats traités; par le Méthidathion et l'EQAC et à la combinaison (Méthidathion/EQAC).	102
40	Variation de l'activité enzymatique Glutathion-S-transférase (nmol GSH/min/mg prot) dans les organes (foie, reins et cerveau) chez les rats témoins et les rats traités; par le Méthidathion et l'EQAC et à la combinaison (Méthidathion/EQAC).	102
41	Variation de l'activité enzymatique de la superoxydedismutase (U/mg prot) dans les organes (foie, reins et cerveau) chez les rats témoins et les rats traités; par le Méthidathion et l'EQAC et à la combinaison (Méthidathion/EQAC).	103
42	Variation de l'activité enzymatique de la catalase ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{min}/\text{mg prot}$) dans les organes (foie, reins et testicules) chez les rats témoins et les rats traités; par le Méthidathion et l'EQAC et à la combinaison (Méthidathion/EQAC).	103

43	Variation de l'activité enzymatique de l'acétylcholinésterase dans le cerveau chez les rats témoins et les rats traités par le Méthidathion et l'EQAC et à la combinaison (Méthidathion/EQAC).	104
44	Coupes histologiques des reins de rat témoin et traités par l'extrait aqueux d'Artemisiacampestris colorés à Hématéine-Eosine 100X.	105
45	Coupes histologiques des reins de rat traité par le Méthidathion (5 mg/Kg PC) et par la combinaison Méthidathion/Extrait aqueux d'Artemisiacampestris colorés à Hématéine-Eosine 100X	106

LISTE DES TABLEAUX

<u>Tableau</u>	<u>Titre</u>	<u>Page</u>
01	Classement des IOP selon leur niveau de toxicité	6
02	Propriétés physico-chimiques du sélénium et ses composés	24
03	les différentes sélénoprotéines ayant un rôle biologique connu	25
04	Composition de l'alimentation pour 1 Kg d'aliment (ONAB)	48
05	Variation des paramètres hématologiques et de la concentration en fer sérique chez les rats témoins et les rats traités; par le Méthidathion, sélénium et zinc et à la combinaison (Méthidathion/ Sélénium+zinc).	76
06	Activité enzymatique de la GPx ($\mu\text{mol GSH}/\text{min}/\text{mg}$), de la GST ($\text{nmol GST}/\text{min}/\text{mg prot}$), de la SOD ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg prot}$) et de la CAT ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{min}/\text{mg prot}$) dans les organes (Foie, reins et testicules) chez les rats témoins et les rats traités ;par le Méthidathion et à la combinaison (Méthidathion/Sélénium+zinc).	83
07	Variation de la concentration sérique (ng/ml) en triiodothyronine (T3), en thyroxine (T4) et en testostérone chez les rats témoins et les rats traités ; par le Méthidathion et à la combinaison (Méthidathion/ Sélénium+zinc)	84
08	Résultats des réactions de caractérisation des différents groupes chimiques recherchés dans la partie aérienne de la plante.	87
09	Composition chimique de l'huile essentielle de la partie aérienne d'Artemisiacampestris	90
10	Variation des paramètres hématologiques et de la concentration en fer sérique chez les rats témoins et les rats traités par le Méthidathion et l'EQAC et à la combinaison (Méthidathion/EQAC).	95
11	Variation de quelques biomarqueurs plasmatiques de la fonction hépatique et rénale chez les rats témoins et les rats traités par le Méthidathion et l'EQAC et à la combinaison (Méthidathion/EQAC).	98

ABREVIATIONS

AC : *Artemisia campestris*

AGPI : Acide gras polyinsaturé

ALAT: Alanine transaminase

AST: Aspartate transaminase

BHT: Butyl-hydroxy-toluène

BSA : Sérum albumine bovine

CAT : Catalase

CCMH : Concentration corpusculaire moyen en hémoglobine

CDNB : 1-chloro, 2,4-dinitrobenzène

CE : Equivalents de Catéchine

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

DPPH : 2,2-diphényle-1-picrylhydrazyle

EDTA : Ethylène diamine tétra-acétique

GAE : Equivalents d'acide gallique

GPx : Glutathion peroxydase

GSSG : Glutathion oxydé

GST : Glutathion S-transférase

LDH: Lactate déshydrogénase

LDL: Low density lipoprotein

LOOH : Hydroxyde lipidique LOO.: Radical peroxyde

LPO : Les peroxydes lipidiques

MD : Méthidation

Mn-SOD : Superoxydedismutase associée au manganèse

·OH: Radical hydroxyle.

¹O₂: Oxygène singulet.

O₂⁻: Radical superoxyde (anion superoxyde).

O₃: Ozone

PLT: Plaquette

QE: Equivalents de Quercétine

SOD: Superoxyde dismutase

TBA: 2-Thiobarbituric acid: L'acidethiobarbiturique

TBG:Thyroid Binding globulaire

TCA : Trichloroacétique

TTR : Transthyrétine

VGM : Volume globulaire moyen



INTRODUCTION

Introduction

Le stress oxydant est un facteur potentialisant l'apparition de plusieurs pathologies telles que les maladies cardiovasculaires. Il joue également un rôle dans l'apparition des facteurs athérogènes telles que l'activation des médiateurs pro-oxydants, les superoxydes et les monoxydes d'azote. Le stress oxydatif est dû à la génération excessive de radicaux libres incluant les espèces réactives de l'oxygène et de l'azote engendrant des endommagements de la membrane lipidique, des protéines et des macromolécules à l'origine de l'installation de plusieurs maladies tels que le cancer, l'athérosclérose et les maladies neuro-dégénératives (Defraigne et Paincemail., 2007).

Le stress oxydant est également généré sous l'effet d'oxydants environnementaux. En effet, la vie moderne nous confronte à l'absorption d'alcool ou de médicaments, à l'exposition prolongée au soleil, au tabagisme et à la pollution, qui sont des situations provoquant une surproduction d'espèces réactives d'oxygène dans notre organisme (Aoussou, 2002). L'usage des pesticides est devenu une partie intégrante du système agricole moderne. Pendant des siècles, ces composés ont été utilisés en agriculture pour améliorer la production alimentaire par l'éradication des insectes indésirables et le contrôle des vecteurs de maladies (Baud et al., 2009). Parmi les pesticides usuels, les organophosphorés (OP) sont largement utilisés en agriculture, en médecine et en industrie. Les organophosphorés sont peu stables dans le milieu naturel, ou elles sont facilement dégradées par les microorganismes, en métabolites qui entrent dans les grands cycles de synthèse biologique. Néanmoins, la mauvaise application des insecticides, leur stockage sans précaution, les rejets de résidus sont responsables d'une contamination importante de l'eau, du sol et des récoltes, particulièrement les fruits et les légumes (McCauley et al., 2006).

L'organisation mondiale de la santé (OMS) estime à 3 millions le nombre de cas d'intoxication par les pesticides accidentelles et volontaires avec une mortalité moyenne de 8-10 % (220 000 morts) mais pouvant atteindre 20% dans certaines régions du globe. En effet la toxicité des organophosphorés résulte de l'inhibition de l'acétylcholinestérase dans les tissus nerveux centraux et périphérique, ce qui provoque une accumulation du neuromédiateur cholinergique, l'acétylcholine au niveau des synapses (Baud et al., 2009).

INTRODUCTION

Le **Méthidathion** (S-2,3-dihydro-5-methoxy-2-oxo-1,3,4-thiadiazol-3-yl-methyl-O,O-dimethylphosphodithioate) un insecticide et un acaricide organophosphoré largement utilisé dans l'agriculture pendant la période de préfloraison des arbres fruitiers. Selon l'OMS le Méthidathion est classé comme étant un insecticide hautement toxique. A cause de son caractère lipophile, les chercheurs ont mis en avant la forte affinité du Méthidathion pour les molécules biologiques comme raison principale de sa toxicité. Il a la particularité de se fixer aux membranes biologiques ainsi qu'aux parois cellulaires, ce qui expliquerait la perturbation des ultra-structures et les problèmes de croissance (Lewis, 2007; Benois, 2013).

La présence du Méthidathion dans l'organisme induit la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) tels que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), les radicaux hydroxylés (HO), oxyde nitrique ($NO\cdot$) et les anions superoxydes ($O_2^{\cdot-}$) perturbant le statut redox des cellules, ce qui occasionne un stress oxydatif. De ce fait, l'organisme dispose de système enzymatiques complexes lui permettant de biotransformer les xénobiotiques principalement par le foie et secondairement par les reins, les poumon et l'intestin (Descotes et al., 1992).

Une étude sur le diméthoate, le glyphosate et le zinebe administrés aux rats pendant cinq semaines à différentes concentrations (25, 50, 100 mg/kg) montre que ces pesticides provoquent le stress oxydatif dont une diminution du glutathion réduit considéré comme un antioxydant idéal (Astiz et al., 2012).

Les **oligo-éléments** y compris le **sélénium** (Se) et le **zinc** (Zn) ont gagné ces dernières années leurs lettres de noblesse et connaissent même un encouragement excessif auprès du public. L'émergence de ces nutriments est le résultat de progrès considérables sur la connaissance du fonctionnement des enzymes, de l'hormonologie, de l'immunologie et de la biologie moléculaire qui ont montré le rôle important joué par ces éléments. De plus, la propriété la plus importante pour expliquer le rôle de ces minéraux est leur capacité de se fixer sur des protéines (métalloprotéines) modifiant ainsi la forme de ces protéines et en changeant alors leurs propriétés (Lawerys et Lison, 2007).

Durant ces dernières années une recrudescence d'intérêt est à remarquer concernant les effets biologiques des antioxydants naturels à base de plante inclus dans la lutte contre le stress oxydatif. En effet, les plantes médicinales sont utilisées depuis l'antiquité pour soulager et guérir les maladies humaines grâce à la présence de centaines, voire des milliers de composés naturels bioactifs appelés les métabolites secondaires. Ces derniers sont par la suite

INTRODUCTION

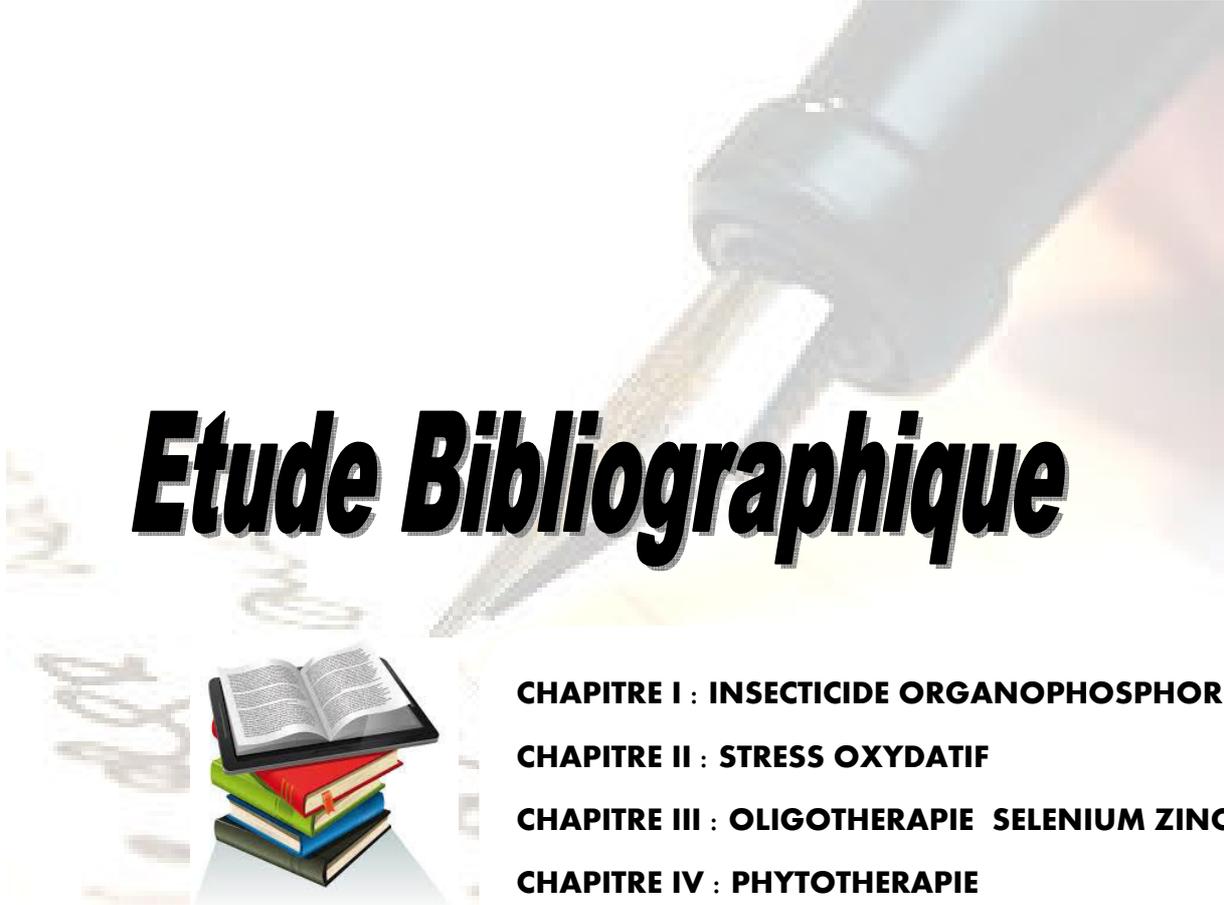
accumulés dans différents organes et parfois dans des cellules spécialisées de la plante (Okafor et Ham, 1999).

Parmi les plantes médicinales qui constituent le couvert végétal, se trouve le genre *Artemisia*, ce dernier est largement distribué surtout dans les régions semi arides. De nombreuses espèces de ce genre sont utilisées en médecine traditionnelle parce qu'elles renferment plusieurs molécules ayant des vertus thérapeutiques, parmi les espèces les plus connues se trouve *Artemisia campestris*. Cette plante, largement utilisée pour traiter les troubles digestifs, les ulcères, les brûlures et la diarrhée, a fait l'objet de recherches relatives à la détermination de ses composantes biochimiques (De Pascual et al., 1984 ; Rauter et al., 1989 ; Joao et al., 1998 ; Akrou et al., 2001).

Le but de ce présent travail consiste à étudier les effets préventifs et thérapeutiques contre la cytotoxicité induite par le Méthidathion, qui pourrait être efficace à faible dose, moins toxique, avec un mode d'administration convenable et ayant un pouvoir antioxydant puissant.

Pour ce faire, on a élaboré un plan de recherche en deux parties :

- ✓ La première partie de ce travail est consacrée à l'étude des connaissances actuelles concernant le Méthidathion, le stress oxydatif, le sélénium, le zinc et l'*Artemisia campestris*;
- ✓ La deuxième partie sera consacrée à l'étude expérimentale qui vise à :
 - la détermination de quelques paramètres de croissance ;
 - l'étude de quelques paramètres biochimiques et hématologiques;
 - l'évaluation du système pro/anti-oxydant par la détermination de quelques éléments non enzymatiques comme le malondialdéhyde (MDA) et le glutathion réduit (GSH) et des activités enzymatiques; de la glutathion peroxydases (GPx), de la glutathion-S-transférase (GST), du superoxyde dismutase (SOD) et de la catalase (CAT);
 - l'étude histologique de deux organes cibles (foie et rein).



Etude Bibliographique

CHAPITRE I : INSECTICIDE ORGANOPHOSPHORES

CHAPITRE II : STRESS OXYDATIF

CHAPITRE III : OLIGOTHERAPIE SELENIUM ZINC

CHAPITRE IV : PHYTOTHERAPIE

CHAPITRE I : INSECTICIDE ORGANOPHOSPHORÉS

1. Pesticides

1.1. Définition

Le terme de pesticide est défini comme une substance destinée à repousser ou à combattre toute espèce indésirable végétale ou animale, pendant la production, le stockage, le transport, la distribution ou la transformation des denrées destinées à l'alimentation humaine ou animale. La première utilisation de ces produits en agriculture date de l'antiquité, leur développement ayant ensuite suivi celui de la chimie minérale (Chassard-Bouchaud, 1995).

Les pesticides sont encore appelés produits phytosanitaires (produit de protection des plantes). Ils sont donc toute substance chimique naturelle ou de synthèse utilisée en agriculture afin de protéger les cultures contre les parasites, insectes, mauvaises herbes, rongeurs et champignons (Bédry et Cheron, 2002; Allsop et al., 2015).

Selon la définition de la FAO, un pesticide est une substance utilisée pour neutraliser ou détruire un ravageur, un vecteur de maladie humaine, une espèce végétale ou animale gênante au cours de la production de produit agricole (FAO, 1995).

1.2. Classification des pesticides et mode d'action

Les pesticides sont le plus souvent classés en fonction des espèces nuisibles visés (insecticides, herbicides et fongicides), ils peuvent également être classés en fonction de leur famille chimique dont les principales catégories sont les organophosphorés (OPP), les organochlorés (OCP), les carbamates et les pyréthroides (Allsop et al., 2015).

1.2.1. Classification selon les espèces nuisibles (Duchemin, 2006).

- a) **Insecticides** : Destinés à tuer les insectes et empêche le déroulement normal de leur cycle de vie, parmi les principales familles on distingue : les insecticides organophosphorés, les carbamates, les pyréthroides et les organochlorés, dont le mode d'action est majoritairement impliqué sur le système nerveux (action sur les synapses et les neuromédiateurs), la respiration (inhibition du transport des électrons dans les mitochondries et inhibition de la phosphorylation oxydative) et sur la cuticule (inhibition de la chitine).
- b) **Herbicides** : Destinés à limiter l'installation d'espèces végétales adventices, on distingue deux familles importantes qui sont les acides amino-phosphoriques (glyphosate) et les triazines (atrazine, simazine). les herbicides possèdent plusieurs actions dont les principales sont ; l'inhibition de la photosynthèse (inhibition du PS I et du PS II), inhibition de la synthèse des caroténoïdes (inhibition de la PDS et de la 4-

HPPD), de la synthèse des lipides (inhibition de l'enzyme ACCase, des élongases et des enzymes de cyclisation du GGPP), de la synthèse des chlorophylles et des acides aminés au niveau de chloroplastes, mais aussi ils provoquent une perturbation de la régulation de l'auxine AIA (inhibiteurs de la division cellulaire, blocage de la tubuline, blocage de la synthèse de l'acide folique).

- c) **Fongicides** : les fongicides assurent une excellente protection contre le développement des champignons et parasites, et permettent l'obtention des plantes saines. On distingue deux catégories de fongicides : fongicides organiques et fongicides inorganiques. Le mode d'actions est reparti en l'action sur les processus respiratoires (inhibition des complexes II et IIIH, phosphorylation oxydative, inhibition de la germination), l'action sur la biosynthèse des stérols, de l'ARN et de l'ADN et sur la biosynthèse des mélanines.

1.2.2. Classification selon la famille chimique

a) Pesticides organophosphorés (OPP)

Actuellement les composés organophosphorés (OPs) représentent plus de 40 % des insecticides employés sur le marché mondiale (Andreescu, 2002). Ils regroupent une large gamme de structures chimiques dont les principaux OPP regroupent l'acéphate, le chlorpyrifos, le diazinon, le parathion, le malathion et le méthidathion. Leur mode de toxicités consiste à l'inhibition irréversible de l'acétylcholinestérase (AChE), qui se trouve bloquée sous une forme phosphorylée inactive. Cette inhibition provoque l'accumulation du neurotransmetteur « acétylcholine » au niveau des synapses, provoquant une sur-expression cholinergique et une paralysie du système nerveux entraînant la mort de l'insecte (Fournier, 1988 ; Allsop et al., 2015 ; Baud et al., 2009).

b) Pesticides organochlorés (OCP)

Les pesticides organochlorés constituent la plus vieille classe d'insecticides de synthèse; ce sont les premiers à avoir été largement utilisés. On les utilise en agriculture, comme pesticide domestique pour le traitement des bois et pour le traitement externe de la gale et des pédiculoses en médecine et en vétérinaire. Les principaux organochlorés comprennent notamment le tétrachlorure de carbone, le chlordane, le DDT et l'heptachlore.

Cependant, les OPC sont fortement liposolubles, ils s'accumulent dans les graisses des organismes vivants, d'où un problème majeur d'écotoxicité et de contamination de la chaîne alimentaire. De plus, tous les organochlorés n'ont pas le même mode d'action; le DDT semble agir sur la transmission de l'influx nerveux en perturbant les flux transmembranaires de

sodium et potassium. Les cyclodiènes, le lindane, l'endosulfan agissent sur la synapse GABAergique en inhibant les flux membranaires de chlore à travers des récepteurs des canaux postsynaptiques au GABA (Bloomquist, 1996 ; Descotes et al., 1992 ; Allsop et al., 2015).

c) Carbamates

Les carbamates sont des insecticides à large spectre utilisés couramment. Ce sont des esters de l'acide carbamique généralement non hydrosolubles. Leur mode d'action est comparable à ceux des organophosphorés, ils sont généralement neurotoxiques et ils inhibent également l'acétylcholinestérase. Les carbamates agissent en inactivant de façon réversible cette enzyme par le biais de la carbamylation d'un résidu sérine du site actif; l'acétylcholine n'est plus dégradé et s'accumule alors dans l'espace inter-synaptique provoquant ainsi une hyperexcitabilité évoluant vers la mort. Les principaux carbamates comprennent : le carbaryl, le manèbe, le pirimicarbe et le méthiocarbe (Morais et al., 2012).

d) Pyréthrinoides de synthèse

Les pyréthroïdes sont des esters liposolubles, ils entrent dans la composition de multiples insecticides domestiques (aérosol, diffuseurs électrique, rubans à combustion lente), et dans les insecticides à usage médical utilisés dans la lutte anti-vectorielle (Descotes et al., 1992). En effet, ce sont des neurotoxiques qui agissent en retardant ou empêchant la fermeture des canaux sodiques membranaires le long de l'axone, ils perturbent ainsi la transmission de l'influx nerveux au niveau des neurones centraux ou périphériques (Soderlund, 2012). Les pyréthroïdes sont efficaces à très faibles doses par rapport aux carbamates ou organophosphorés et sont en général d'une plus grande sécurité d'utilisation pour l'homme et les insectes. Parmi les principaux pyréthrinoides, on distingue : cyhalothrine, cyperméthrine, deltaméthrine et perméthrine (Koureas et al., 2012).

2. Insecticides organophosphorés

2.1. Définition

Selon l'OMS, les organophosphorés (OP) sont responsables d'une mortalité élevée par intoxication, près de 200.000 décès par an dans le monde. Ces substances sont très utilisées dans le domaine industriel, agricole et domestique et comportent des adjuvants (hydrocarbure, glycol, eau) parfois aussi dangereux que la matière active. Ces produits font partie de la seconde génération d'insecticides, ils ont été développés à partir d'armes chimiques utilisées durant la seconde Guerre Mondiale (Istamboulie, 2009). Les IOP sont peu solubles et peu volatiles et sont des anticholinestérasiques très liposolubles. En effet, ils se fixent aux deux

types de cholinestérases ; acétylcholinestérase (système nerveux central., des muscles et des globules rouges) et pseudo cholinestérase plasmatique (système nerveux végétatif) entraînant des syndromes cholinergiques dont la gravité dépend de la molécule, de la voie d'intoxication et de la quantité absorbée (Bedry et cheron, 2002 ; Saissy et Ruttiman, 1999).

2.2. Nature chimique des insecticides organophosphorés

Les composés organophosphorés ont une structure chimique et un mode d'action commun. Il s'agit d'un ester d'alcool avec l'acide ortho phosphorique ou avec l'acide thiophosphorique. La formule chimique générale a été définie par Schrader (Testud et Grillet, 2007). Voir Figure 1.

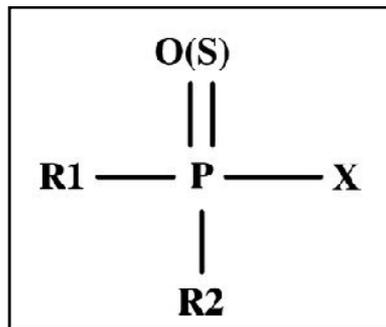


Figure 1 : Structure chimique générale des organophosphorés (Thabet et al, 2009)

R1 et R2 : les radicaux alkyles, X : le substituant

Selon le substituant (X), 3 classes principales d'importance variable peuvent être définie :

- ✓ OP aliphatique (dichlorvos, acéphate, malathion, diméthoate, phorate, trichlorfon)
- ✓ OP à cycle phényle (phosalone, parathion, méthylparathion, fenthion)
- ✓ OP à hétérocycle (dichlorpyrifos, Methidathion, phosmet, diazinon)

D'une façon générale, les OP possèdent la fonction (P = O) et sont des inhibiteurs directs et rapides des enzymes. En revanche, les OP contenant la fonction (P = S) sont des inhibiteurs indirects qui sont ensuite métabolisés en leurs composés actifs (P = O). Exemple : le parathion se transforme en paraxon (Thabet et al., 2009).

2.3. Mécanisme d'action des insecticides organophosphorés

Grace à leur caractère très lipophile, ils franchissent aisément toutes les barrières biologiques et se fixent d'une façon covalente sur le groupe hydroxyle de la sérine du site actif de l'acétylcholinestérase ce qui empêche la liaison de cette enzyme avec l'acétylcholine (ACh). A l'état normal., L'interaction de l'acétylcholine avec le récepteur provoque une dépolarisation de la membrane post synaptique, générant ainsi un potentiel d'action qui assure la transmission du signal nerveux au niveau des ganglions du système nerveux autonome et de

la jonction neuromusculaire des fibres post ganglionnaire du système parasympathique et du système nerveux végétatif (Saissy et Ruttiman, 1999). L'hydrolyse de l'acétylcholine par l'acétylcholinestérase, permet au système de revenir à son état de repos (Bocquené et Galgani, 1998). Voir Figure 2

L'acétylcholinestérase (AChE) est une des enzymes les plus efficaces et les plus rapides connues actuellement (une efficacité d'hydrolyse (turnover) de 1000 à 20 000 molécules /seconde selon l'espèce). Elle appartient à la famille des hydrolases synthétisée dans le globule rouge et le tissu nerveux, son rôle est d'assurer le bon fonctionnement des synapses acétylcholinergiques en évitant l'accumulation du neurotransmetteur (Lawerys, 1999).

L'inhibition commence par la formation du complexe enzyme-inhibiteur, suivie par la phosphorylation qui inactive l'enzyme de manière irréversible (Figure 03). En effet, la déphosphorylation de cette enzyme inhibée par l'OP est très lente, par conséquent, la phosphorylation devient irréversible par déalkylation, il s'agit d'un phénomène de vieillissement « aging » d'enzyme qui devient non fonctionnel (Thabet et al., 2009). Le résultat de l'inhibition de l'AChE est l'accumulation de l'ACh libéré dans la fente synaptique menant à une hyperstimulation des récepteurs cholinergiques (Rioux, 2002).

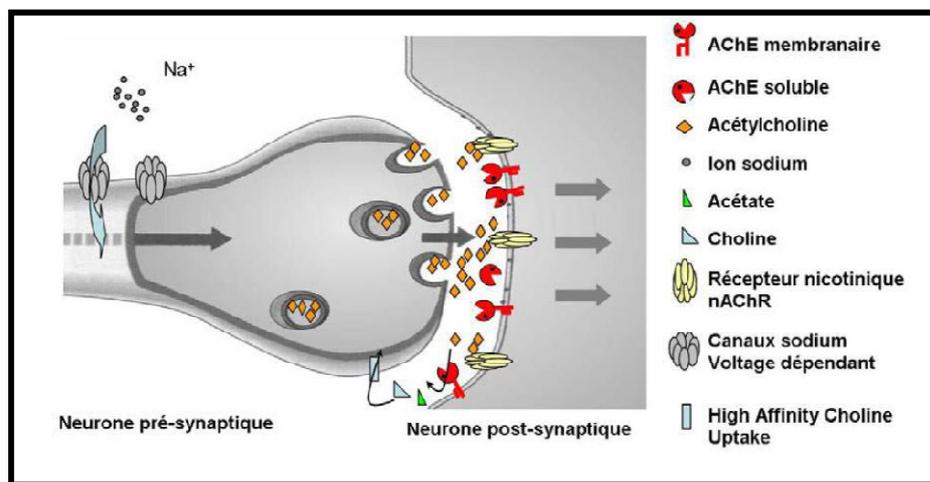


Figure 2 : Hydrolyse de l'acétylcholine par l'AChE au niveau de la synapse cholinergique (Quin, 1987)

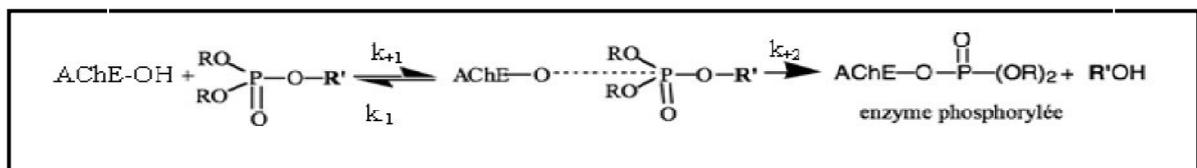


Figure 03 : Mécanisme d'inhibition de l'acétylcholinestérase par les organophosphorés (Lotti, 1995)

Cependant, l'activité sérique redevient normale plus rapidement que l'activité globulaire, en raison de la synthèse hépatique de l'enzyme correspondante environ 1 mois. En revanche, l'activité globulaire se régénère classiquement au rythme de (1%) par jour (correspond au renouvellement des globules rouge au niveau de la moelle osseuse hématopoïétique) (Lawerys, 1999).

Certains insecticides organophosphorés peuvent phosphoryler une protéine du système nerveux central., la neuropathy target estérase (NTE) appelée estérase neurotoxique car elle possède des propriétés neurotoxiques (Thabet et al., 2009).

2.4. Métabolisme des insecticides organophosphorés

Les organophosphorés sont très liposolubles, ils sont donc rapidement dégradés dans le sol et les plantes, parmi les voies d'exposition, on distingue : la voie digestive, cutanée et/ou respiratoire. Dans la majorité des cas l'exposition peut être due à une tentative de suicide, ingestion accidentelle, inhalation ou contact prolongé. Les IOP sont généralement métabolisés dans le foie par le cytochrome P450 générant des métabolites (dialkyl phosphate) qui sont parfois plus toxiques que la molécule mère (Descotes et al., 1992).

2.5. Toxicité des insecticides organophosphorés

2.5.1. Intoxication aiguë

La symptomatologie initiale est fonction de la voie d'entrée (trouble digestif en cas d'ingestion, trouble oculaire en cas de projection, trouble respiratoire en cas d'inhalation. (Descotes et al., 1992). L'intoxication par les IOP est cliniquement apparente en fonction du degré d'inhibition de l'acétylcholinestérase. Ainsi, on en distingue trois degrés : léger, modéré et grave (Descotes et al., 1992 ; Onil, 2007). En effet, le système respiratoire représente la cible majeure des organophosphorés marquée par une dépression respiratoire (Baud et al., 2009). Cependant, l'OMS classe les OPIs par niveau de toxicité en se basant sur leur dose létale (DL50) en trois groupes (très toxique, toxique et peu toxique), reportés dans le Tableau 1 (Descotes, 1992).

Tableau 1: Classement des insecticides organophosphorés selon leur niveau de toxicité (Descotes et al., 1992)

DL 50	Exemple	Toxicité	Utilisation
DL < 50	Méthidathion, parathion	Très toxique	Insecticide de contact
50 < DL50 < 500	Chlorpyrifos, diclorvos, diazinon	Toxique	Insecticide de contact
DL50 > 500	Acéphate, malathion, chlorthion, bromophos	Peu toxique	Insecticide de contact à large spectre

DL 50 : dose létale qui tue 50 % de population, IOP : Insecticide organophosphoré

2.5.2. Intoxication chronique

L'exposition chronique aux IOP se manifeste par des troubles digestifs et neurologiques (céphalée, asthénie, trouble de l'humeur et du comportement, nausée, diarrhée chronique), ainsi que l'installation d'une neuropathie périphérique sensitivomotrice (Descotes et al., 1992). Une des caractéristiques de l'exposition chronique aux IOP est la désensibilisation des récepteurs, ce qui diminue l'effet toxique de l'accumulation des IOP. Ce phénomène explique que des travailleurs exposés à de faibles doses pendant plusieurs semaines peuvent avoir une inhibition de 70 % des AChE sans présenter de symptômes (Onil, 2007).

3. Insecticide organophosphoré (le Méthidathion)

Le Méthidathion (MD) est un insecticide et acaricide non systémique de la famille des organophosphorés, il s'agit d'un inhibiteur de cholinestérase empêchant ainsi la transmission de l'influx nerveux et entraînant la mort de l'insecte (Washburn, 2003 ; Chopade et Dauterman, 1981). Le Méthidathion est largement utilisé dans l'agriculture permettant le traitement de la préfloraison et cela depuis 1974 par la corporation Ciba Geigy. Il est lancé sous des noms commerciaux (Ultracide, Supracide, suprathion et le Medacide) (Lewis, 2007).

3.1. Propriétés physico-chimiques

Le Méthidathion est un concentré liquide d'une couleur verte, caractérisé par une odeur légère, un poids moléculaire 302.3g/mol et une densité 1.445g/ml. Il s'agit de la (C₆H₁₁N₂O₄PS₃) dont la formule chimique est : « S-2,3-dihydro-5-methoxy-2-oxo-1,3,4-thiadiazol-3-yl-methyl-O,O-dimethylphosphodithioate » représenté dans la Figure 4. En effet, il est peu soluble dans l'eau (220 mg/l) par contre, il est très soluble dans les solvants comme le cyclohexane (850g/l), l'acétone (690g/l), l'xylène (600g/l) et l'éthanol (260g/l) (Lewis, 2007).

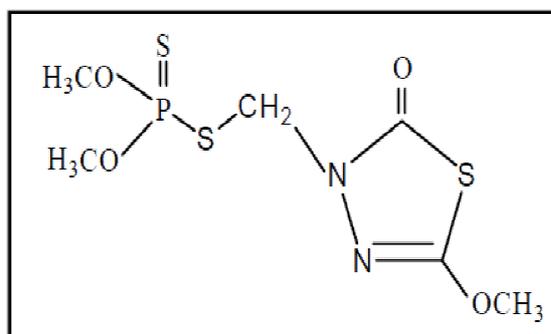


Figure 4 : Structure chimique du Méthidathion (Washburn, 2003)

3.2. Utilisation

L'application du Méthidathion doit être effectuée à l'aide d'un pulvérisateur approprié et soigneusement calibré (pulvérisateur à dos ou tracté) avec une dose de 150 cc/hl. Les principaux cibles du MD sont ; la cochenille, le puceron, le carpocapse, le charançon, la tordeuse orientale de pêcher, la teigne de l'olivier et les acariens, dont les cultures concernées sont principalement, les arbres fruitiers à pépins (pommiers, poiriers), les arbre fruitiers à noyaux (pêchers, abricotiers, pruniers), ainsi que les agrumes, les oliviers, les pommes de terre, les légumineuses potagères (pois) et les arbres et arbustes d'ornement (rosiers) (Boltz et al., 2008).

3.3. Devenir dans l'environnement

Après pulvérisation, le Méthidathion et ses métabolites sont peu mobiles dans le sol, donc il est peu persistant et subit une dégradation rapide dans le sol et l'eau par photolyse et action microbienne, sa demi-vie est de 3-18 jours.

3.4. Mode d'action et biotransformation de Méthidathion

3.4.1. Mode d'action

Le Méthidathion, comme tous les insecticides organophosphorés, agit en inhibant l'acétylcholinestérase (AChE), notamment du système nerveux central., du muscle et du sang ; par conséquent, une accumulation d'acétylcholine au niveau de la plaque motrice et des synapses. Le MD agit plus particulièrement par phosphorylation du résidu sérine de l'enzyme, formant ainsi un complexe avec l'AChE d'abord réversible, puis irréversible. L'accumulation de l'acétylcholine cause initialement une stimulation puis rapidement un épuisement des récepteurs post-synaptiques (Washburn, 2003; Lewis, 2007; Boltz et al., 2008).

3.4.2. Biotransformation

a) Absorption :

Le Méthidathion est absorbé quelle que soit la voie d'exposition, orale, respiratoire, cutanée, en raison de son caractère liposoluble (Boltz et al., 2008). D'autres études, réalisées sur des rats mâles ont montré que le MD est mieux absorbé par la voie orale (100 %) que par la voie cutanée (50 %) (Lewis, 2007).

b) Distribution

Après absorption, le Méthidathion est distribué dans l'ensemble de l'organisme notamment (le foie, les reins, les globules rouges), ainsi il est capable de franchir les barrières hémato-encéphalique et placentaire (Boltz et al., 2008).

c) Métabolisme

Le Méthidathion, comme tous les xénobiotiques, est métabolisé dans le foie par le glutathion-S-transférase en trois métabolites oxon non polaires notons, le sulfide, le sulfoxyde et le sulfone. La forme P=O est le plus souvent moins stable mais très toxique car elle possède une structure propice à inhiber fortement l'AChE des différents organismes contaminés (Ménager, 2007). Il s'agit de la S-méthylation résultant de l'oxydation du dérivé mercaptométhyl par clivage de la liaison P = S en présence des monooxygénases à FAD dépendante, et le cytochrome P450 à NADPH et O₂ dépendant (Chopade et Dauterman, 1981 ; Min et al., 2005).

Une étude a été réalisée sur les plantes et les animaux, en utilisant le Méthidathion P³² confirme l'existence des métabolites hydrosolubles tels que, le diméthyle phosphate, le diméthyl-phosphothioate et le méthyle hydrogène phosphate et le desméthyle méthidathion (Chopade et Dauterman, 1981). La réaction se fait par substitution d'un atome de Soufre par un atome d'Oxygène, ainsi le métabolisme ultérieur est catalysé par des estérases afin de provoquer une hydrolyse des fonctions esters phosphoriques (Lewis, 2007).

Une autre voie a été identifiée par une étude qui a été réalisée sur la tomate, il s'agit de la conjugaison de la GSH avec le Méthidathion ; le composé formé (glutathion conjugué) est ainsi converti en libérant l'acide glutamique en cysteinyl-glycine conjugué, ce dernier est à son tour converti en cystéine conjugué avec libération de la glycine (Chopade et Dauterman, 1981) (Figure 5).

d) Excrétion

L'élimination du Méthidathion est majoritairement urinaire et/ou respiratoire sous forme de métabolites urinaires de faible toxicité et de dioxyde de carbone (CO₂) respectivement. Les métabolites urinaires du Méthidathion sont principalement le phosphate diméthyle (33.6 %), le phosphorothioate (24.2 %), le dérivé desméthyle (11.1 %), le méthyle phosphate et l'acide phosphorique (1.5 %) (Lewis, 2007).

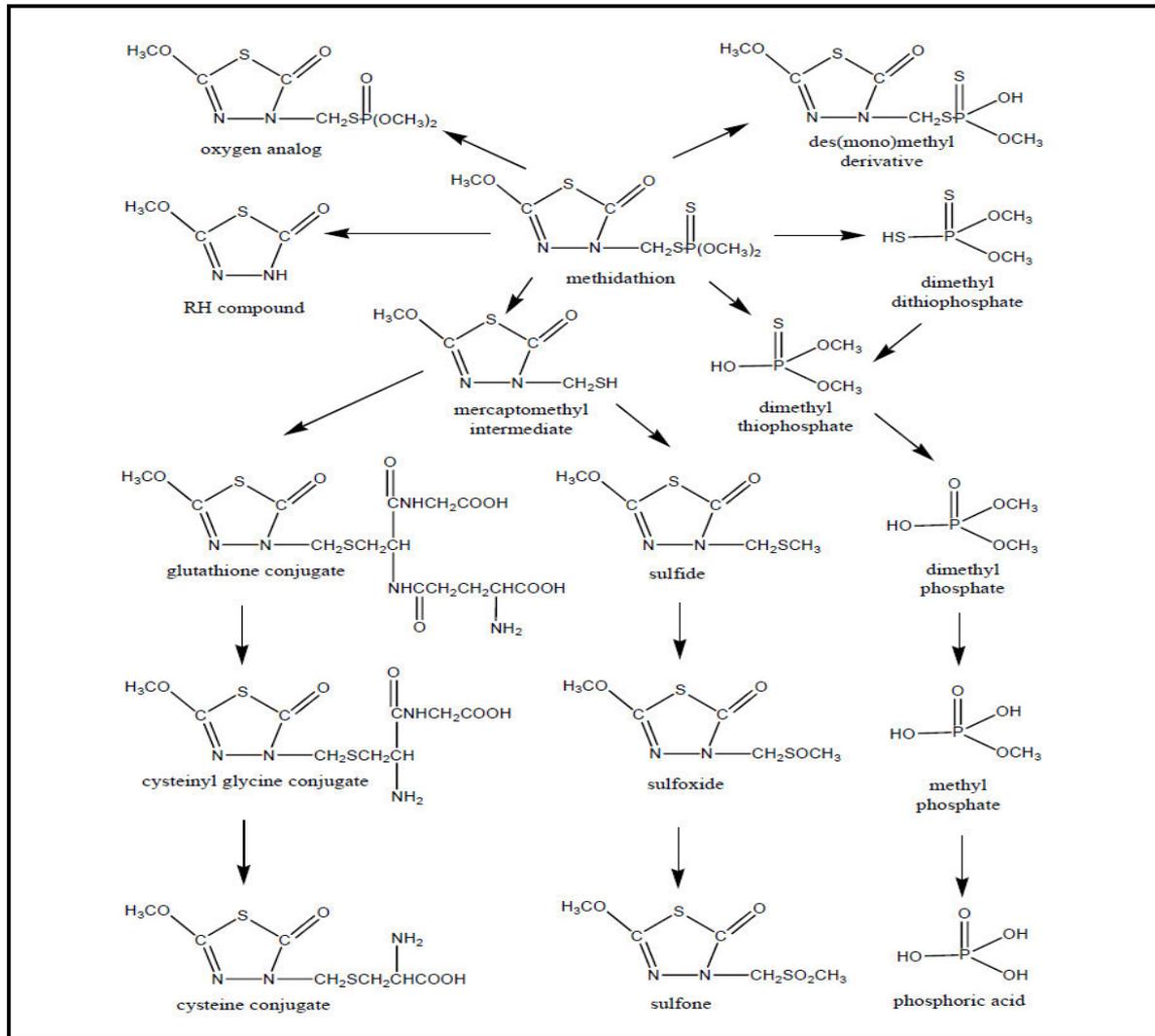


Figure 5 : Voie métabolique de Méthidathion chez les mammifères (Lewis, 2007)

3.4.3. Toxicité de Méthidathion

Quelle que soit la voie d'exposition, le Méthidathion inhibe durablement les cholinestérases dans différents tissus notamment le système nerveux central., le muscle et le sang (Boltz et al., 2008). Il provoque ainsi la toxicité dans différents organes citons les gonades, le cœur, le foie et les reins (Gokalp et al., 2003 ; Yavuz et al., 2004; Sulak et al., 2005 ; Guney et al., 2007).

a) Toxicité aiguë

Le Méthidathion est classé par l'OMS comme étant un insecticide hautement toxique (DL 50 chez le rat par voie orale est de 1-20 mg/Kg). Comme tout insecticide organophosphoré, il provoque l'apparition des premiers symptômes en fonction de la voie d'exposition tels que, les troubles digestifs (nausée, vomissement, douleurs abdominales, diarrhée), troubles respiratoires (dyspnée) et troubles oculaires (myosis) ou cutanés

(fasciculation, sueur). Si l'inhalation est importante, ces signes systémiques apparaissent dans des délais variables allant de quelques minutes jusqu'à 12 h après le début d'intoxication (Boltz et al., 2008).

b) Toxicité chronique

La dose sans effet de stimulation cholinergique chez l'homme, est de 4 mg/Kg, ainsi l'exposition prolongée au Méthidathion entraîne des signes muscariniques (hypersécrétion des glandes exocrines, augmentation du tonus des muscles lisses, bradycardie et hypotension), nicotiniques (atteinte des muscles striés, hyperstimulation sympathique) ce qui entraîne une tachycardie et/ou hypertension artérielle et signes centraux attendus avec confusion, ataxie puis coma compulsif (Lewis, 2007 ; Boltz et al., 2008).

c) Toxicité pour certains organes

L'administration du Méthidathion provoque des dommages oxydatifs (plasmatique et histopathologique) au niveau des organes de détoxification (foie et reins). Selon Gokalp et al., (2003) une dose de 150 mg/Kg de MD administré par voie orale provoque des perturbations au niveau hépatique marquées par une variation enzymatique (ALP, AST, LDH) et histologique (dilatation sinusoidale, dégénération granulaire, infiltration et hémorragie). Les résultats de recherche de Sulak et al (2005) indiquent que le Méthidathion à une dose de 5 mg/Kg (administré par gavage) engendre des dommages oxydatifs au niveau des reins (congestion vasculaire, sclérose glomérulaire et nécrose tubulaire) suivis par une augmentation du taux de MDA et une diminution de l'activité cholinestérasique.

CHAPITRE II : STRESS OXYDATIF

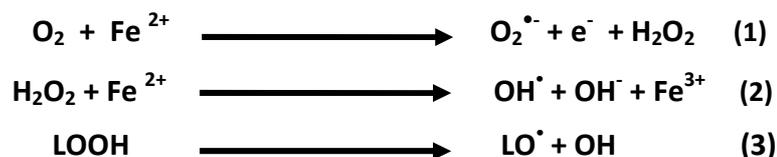
1. Stress oxydatif

1.1 Définition

Au sein de notre organisme, il existe un équilibre entre les espèces réactives (ER), présentes à l'état basal en faible concentration et le système antioxydant qui contient notamment des enzymes, des vitamines, des oligoéléments et de glutathion (Delattre et al. 2007). Le stress oxydant est défini comme un déséquilibre de la balance entre les systèmes oxydants et les capacités antioxydants d'un organisme, d'une cellule ou d'un compartiment cellulaire (Barouki, 2005). Toutefois, ce déséquilibre est provoqué soit par une production exagérée des oxydants (espèces réactives de l'oxygène) et/ou par une diminution ou un déficit du système de défense antioxydant. Cependant, le stress oxydant est à l'origine de nombreux effets tant au niveau moléculaire que cellulaire, provoquant des dommages vis-à-vis des principales cibles moléculaires biologiques (Delattre et al, 2003 ; Le bourg, 2006 ; Defraigne et Pincemail, 2007).

1.2 Radicaux libres

Un radical libre (RL) est défini comme une espèce chimique (atome ou molécule) neutre ou chargée, dont la couche périphérique possède un ou plusieurs électrons non appariés ; dit célibataire, dont il est matérialisé par un point en exposant (x^\bullet) (Corinne, 2010). Un radical libre est formé selon deux grandes voies ; soit via le transfert d'électron sur l'oxygène par les métaux de transition (fer, cuivre), voir réactions 1 et 2, soit par une rupture homolytique des liaisons covalentes des molécules en présence de chaleur et lumière (UV, visible), voir réaction 3 (Delattre et al, 2003 ; Cillard et Cillard, 2006).



1.3 Espèces réactive de l'oxygène

1.3.1 Définition des espèces réactives de l'oxygène

Les radicaux oxygénés libres sont nommés espèces réactives de l'oxygène (ERO) ou pour les Anglo-saxons reactive oxygen species (ROS), ils sont de petites molécules comportant au moins un atome d'oxygène (Aurousseau, 2002). Ces espèces sont divisées en deux catégories: espèces radicalaires comme l'anion superoxyde ($\text{O}_2^{\bullet-}$), radical hydroxyle (OH^\bullet), radical hydroperoxyde (HO^\bullet_2), radical peroxyde (RO^\bullet_2), radical alcoxyde (RO^\bullet) et l'oxyde nitrite (NO^\bullet), mais aussi des espèces non radicalaires comme le peroxyde

d'hydrogène (H_2O_2), acide hypochloreux (OHCL), oxygène singulet (1O_2), ozone (O_3) et le peroxydinitrite ($ONOO^-$) (Fontaine, 2002 ; Delattre et al, 2003).

Ces espèces réactives sont des produits normaux du métabolisme, leur production basale correspondrait à 3 % de la quantité totale d' O_2 consommée. Toutefois, une production accrue de ces espèces sera responsable d'une manière directe ou indirecte de nombreux dommages oxydatifs au niveau moléculaire (protéines, lipides, acide nucléique) pouvant affecter considérablement les mécanismes cellulaires (Monique et al, 2003 ; Puy, 2012).

1.3.2 Source et production des espèces réactive de l'oxygène

Le mécanisme de production des différentes espèces réactives de l'oxygène radicalaire et/ou non radicalaire est représenté dans la figure 6.

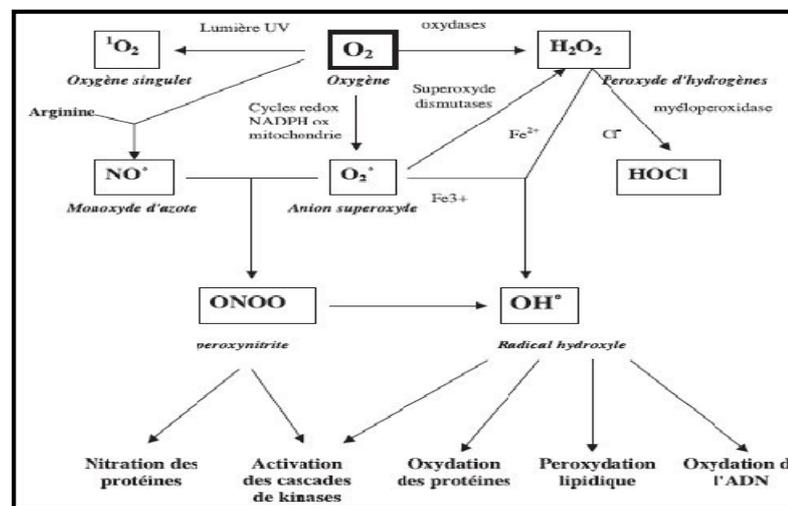


Figure 6 : Production des différents radicaux libres oxygénés (Favier, 2003)

1.3.2.1 ERO radicalaire

a) Anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$)

Il représente la première forme des ERO, il est produit majoritairement par la chaîne mitochondriale (Puy, 2012). Ces radicaux sont relativement peu réactifs par eux mêmes, mais dont la réactivité provient du fait qu'ils donnent naissance à des composés plus réactifs (Delattre et al, 2003). Cependant, il existe plusieurs sources de radical superoxyde :

- **Dans la mitochondrie** : via l'échappement de la chaîne respiratoire, ou le radical superoxyde est produit par réaction de l'oxygène avec un radical demi-ubiquinone (Fontaine, 2002).
- **NADPH oxydase** : est un complexe enzymatique situé sur la membrane des cellules phagocytaires (polynucléaires et macrophages), elle comporte le FAD et un cytochrome b (composé de deux sous unités gp 91 phox et p 22 phox) capable de

réduire l'oxygène en radical superoxyde selon la réaction ci-après (Delattre et al, 2003) :



Remarque: L'activation de la NADPH oxydase est dépendante de la stimulation des cellules phagocytaires (Fontaine, 2002).

- **Xanthine déshydrogénase :** c'est une enzyme ubiquitaire présente au niveau du foie impliquée dans le processus d'ischémie-reperfusion, et dans le catabolisme de l'ATP. Pendant le phénomène d'ischémie-reperfusion, cette enzyme est modifiée en xanthine oxydase qui génère ensuite l'anion superoxyde et l'acide urique en présence d'oxygène et de xanthine ou hypoxanthine (Fontaine, 2002 ; Delattre et al, 2003).
- **Cytochrome P 450 :** il se trouve au sein du réticulum endoplasmique (les microsomes), il s'agit d'une hydrolase qui intervient dans le métabolisme des stéroïdes, médicament et les xénobiotiques, ainsi le fer, présent à l'intérieur du Cyto P 450, est susceptible de réagir avec l'O₂ et produire ainsi l'anion superoxyde en présence de la NADPH, la Cyto P 450 réductase et la flavoprotéine (Borg et Reeber, 2008 ; Delattre et al, 2003).
- **Cyclo-oxygénase :** elles se chargent du métabolisme de l'acide arachidonique, des prostaglandines et prostacyclines (Puy, 2012).
- **Lipo-oxygénase :** elles sont spécialisées dans l'oxydation des acides gras polyinsaturés, prenant l'exemple de la 5-lipooxygénase qui oxyde l'acide arachidonique libre en hydroperoxyde (5-HPETE), précurseur des leucotriènes (Salvayre et Salvayre, 2005).

b) Radical hydroxyle (OH[•])

C'est le radical libre le plus réactif, il est capable de réagir avec un très grand nombre de cibles moléculaires in vivo (constante de vitesse très élevée 10⁹ à 10¹⁰ mol⁻¹), sa durée de vie est de l'ordre de milliardième, il ne diffuse donc pas et réagit sur le même lieu de sa production (Delattre et al, 2003 ; Borg et Reeber, 2008). Sa production est initiée en particulier lors de la réaction de Fenton entre le peroxyde d'hydrogène et le fer ferreux (Aurousseau, 2002), elle est stimulée par la réduction du fer ferrique formé en présence d'anion superoxyde, le résultat des deux réactions correspond à la réaction de Haber- Weiss (Delattre et al, 2003).



c) Oxyde nitrique (NO[•])

L'oxyde nitrique ou le monoxyde d'azote est un radical libre ubiquitaire synthétisé à partir de l'oxygène et l'acide aminé L-Arginine, cette réaction est catalysée par une famille d'enzymes : les NO[•] synthases (NOS). Il existe trois types de NOS : la NOS neuronale, la NOS endothéliale et la NOS inductible présente dans de nombreux tissus et organes. Les deux premières sont constitutives ; leur activité est régulée par la concentration intracellulaire de calcium. Le NO[•] est susceptible de réagir avec l'anion superoxyde O₂^{•-} pour donner le peroxydinitrite ONOO⁻ (Delattre et al, 2003 ; Haleng et al, 2007).



d) Radicale peroxyde (ROO[•])

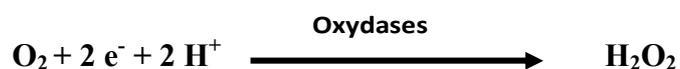
Le radical peroxyde ROO[•] est le dernier résultat dans la chaîne de production des ERO, il provient de l'action oxydante de l'hydroxyle sur les chaînes d'acide gras polyinsaturés (RH), il est donc à l'origine de la peroxydation lipidique (Gutteridge, 1994).

1.3.2.2 ERO non radicalaire

a) Peroxyde d'hydrogène (H₂O₂)

Le peroxyde d'hydrogène est une molécule stable, peu réactive, mais il possède une capacité de diffusion importante et une durée de vie plus longue. Autrement, il est capable de diffuser rapidement à travers les membranes cellulaires. La production d'H₂O₂ s'effectue dans le peroxydosome et la mitochondrie selon deux grandes voies (Monique et al, 2003 ; Borg et Reeber, 2008) :

- C'est le résultat de la réduction biélectronique de l'oxygène en présence d'oxydases (aminoacides oxydases, glycolate oxydase, urate oxydase) selon la réaction suivante :



- C'est le résultat aussi de la dismutation de l'anion superoxyde spontanée ou catalysée par la superoxyde dismutase (SOD) selon la réaction suivante :



La majeure partie de la toxicité de l'eau oxygénée provient de sa capacité de donner le radical hydroxyle en présence de métaux de transition (Fer et Cuivre) (Delattre et al, 2003).

b) Oxygène singulet (¹O₂)

L'oxygène singulet est une forme activée de l'oxygène (état excité), il représente ainsi la source majeure de réaction de photosensibilisation (Delattre et al, 2003).

c) Peroxynitrite (ONOO⁻)

Le peroxynitrite est un oxydant puissant, qui résulte de la réaction du radical NO[•] avec l'anion superoxyde (O₂^{•-}). Il peut secondairement se décomposer en d'autres oxydants (NO[•], OH[•]); en outre, il induit la nitration d'acide aminé aromatique et l'initiation de la peroxydation lipidique (Fontaine, 2002 ; Delattre et al, 2003).

**d) Acide hypochloreux (HOCl)**

L'acide hypochloreux est un oxydant puissant et il est capable de réagir avec de nombreuses molécules biologiques ; ce composé est généré lors de la phagocytose. Il est donc un bactéricide puissant, car il est à l'origine des radicaux libres auxquels les bactéries sont très sensibles. Il est formé à partir du peroxyde d'hydrogène selon la réaction ci-dessous (Delattre et al, 2003) :

**1.4 Conséquences moléculaires du stress oxydant****1.4.1 Oxydation des lipides**

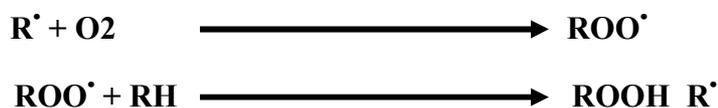
Les acides gras polyinsaturés représentent la cible lipidique majeure des radicaux libres, ainsi l'altération oxydative de ces acides gras est définie par le terme de peroxydation lipidique (Delattre et al, 2003).

Cette réaction d'oxydation a lieu principalement dans les acides gras polyinsaturés des membranes cellulaires (phospholipide, sphingolipides, cardiolipides) ou dans les acides gras polyinsaturés des lipoprotéines (LDL). Parmi les produits finaux formés, le malondialdéhyde (MDA) et le 4-hydroxynonéanal (4-HNE) ont un potentiel mutagène et cancérigène. La peroxydation lipidique peut être évaluée par le dosage des substances réagissant avec l'acide thiobarbiturique (TBARS : Thiobarbiturics acid-reactive substances) (Lefevre et al. 1998). La peroxydation lipidique se déroule en trois étapes :

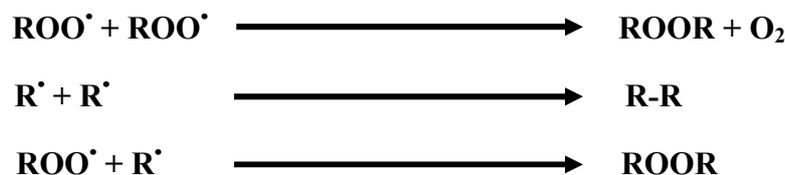
a) Initiation : la réaction d'initiation est induite principalement par radical hydroxyle (OH[•]) dont il est capable d'arracher un hydrogène sur un carbone situé entre deux doubles liaisons des acides gras polyinsaturés (AGPI) ce qui conduit à la formation d'un diène conjugué [R[•]] (Cillard et Cillard, 2006; Borg et Reeber, 2008 ; Collard, 2014; Collard, 2014b).



b) Propagation : le radical lipidique formé réagit très rapidement avec l'oxygène pour former un radical peroxyde (ROO^\bullet). Ce dernier est suffisamment réactif pour arracher un H^+ à un autre AGPI voisin ; ainsi la chaîne de la peroxydation continue à se propager (Delattre et al, 2003 ; Haleng et al, 2007).



c) Terminaison: la réaction en chaîne est interrompue par la combinaison des radicaux lipidiques pour donner des produits non radicalaires stables (Cillard et Cillard, 2006). Ainsi les peroxydes générés pendant la peroxydation seront soit neutralisés par les antioxydants comme le glutathion peroxydase, ou bien ils continueront à s'oxyder en aldéhydes (Malondialdéhyde, 4 Hydroxyalkenal, 4 Hydroxynonenal) (Haleng et al, 2007 ; Borg et Reeber, 2008).



1.4.2 Oxydation des protéines

Dans les conditions physiologiques, les protéines, comportant les acides aminés soufrés, basiques et aromatiques représentent les cibles majeures de l'oxydation par le radical hydroxyle (OH^\bullet) conduisant à la formation de nombreux composés carbonylés et hydroxylés. Selon (Delattre et al, 2003 ; Haleng et al, 2007 ; Borg et Reeber, 2008), ces attaques radicalaires peuvent être classées en 4 catégories

- Oxydation des chaînes latérales des acides aminés** : cette oxydation est catalysée par des métaux de transition en présence d' H_2O_2 ou hydroxyperoxyde (ROOH) et produit ainsi des acides aminés anormaux tels que la 2-oxohistidine et le sulfoxyde de méthionine.
- Oxydation des chaînes polypeptidiques** : cette oxydation est initiée principalement par l'hydroxyle entraînant le départ d'un atome d' H^+ sur le carbone alpha d'une liaison peptidique, et donnant ainsi un radical centré sur le carbone.
- Lipo-oxydation** : cette oxydation concerne la réaction d'une protéine avec un aldéhyde issue de la peroxydation lipidique comme le MDA ou la 4 HDN.

- d) **Glyco-oxydation** : cette oxydation concerne les réactions d'oxydation associées à la glycation, celle-ci résulte de la fixation non-enzymatique d'oses sur des fonctions amines des protéines le plus souvent à l'extrémité N-terminale ou sur un résidu lysine. (Haleng et al, 2007 ; Collard, 2014b).

1.4.3 Oxydation des acides nucléiques

Les acides ribo et désoxyribonucléiques (ADN, ARN) représentent les cibles privilégiées pour les espèces réactives de l'oxygène (ERO). En effet, le radical hydroxyle (OH[•]) présente une haute réactivité et réagit facilement avec les bases puriques et pyrimidiques, comme la guanine qui est transformée en 8-Hydroxy 2-déoxyguanosine (8-OHdG) ; cette dernière est normalement éliminée par le système de réparation de l'ADN mais si le système est défaillant ou dépassé, la 8-OHdG s'accumule et au lieu de s'apparier avec la cytosine, s'associera avec l'adénine, entraînant alors des mutations au sein de l'ADN (Haleng et al, 2007 ; Borg et Reeber, 2008 ; Collard, 2014 ; Collard, 2014b).

Les espèces réactives de l'oxygène ont également des répercussions sur l'ADN mitochondriale touchant ainsi une base pour 8000. En outre, l'ADN mitochondrial est plus sensible aux radicaux libres que l'ADN nucléaire, car il est dépourvu de protéine protectrice de type Histone (Delattre et al, 2003).

1.5 Maladies liées au stress oxydant

Le stress oxydant est impliqué dans le développement de plus d'une centaine de pathologies. Ces derniers, peuvent se diviser en deux groupes : le premier regroupant celles liées principalement à une production excessive d'EROs au niveau mitochondrial telles que le cancer ou le diabète de type 2; le second groupe concerne les cas où une stimulation excessive des NOX ou de la xanthine oxydase entraîne une augmentation de la production d'ER. Dans ce cas une forte composante inflammatoire est également décrite. Les pathologies chroniques concernées sont notamment les maladies cardiovasculaires (l'athérosclérose, maladies cardiaques ischémiques) ou neurodégénératifs (Alzheimer, Parkinson), les troubles consécutifs à l'ischémie-reperfusion (transplantation d'organes), le paludisme et la polyarthrite rhumatoïde (Pincemail et al, 1999; Pincemail et al, 2001; Droge, 2002; Camara et al, 2006; Haleng et al, 2007; Valko et al. 2006; Borg et Reeber, 2008).

1.6 Mécanisme de défense antioxydants

L'organisme dispose un ensemble complexe de défense antioxydants afin de se protéger contre les effets délétères des espèces réactives de l'oxygène (Figure 7), ainsi, on distingue deux sources d'antioxydants : l'une est apportée par l'alimentation (origine exogène) sous la forme de fruits et légumes, l'autre est synthétisée par l'organisme (source

endogène). Ces systèmes antioxydants sont soit des systèmes enzymatiques qui catalysent la conversion des molécules pro-oxydantes, soit des molécules non enzymatiques qui captent rapidement les ERO (Aurousseau, 2002 ; Fontaine, 2002 ; Schulz et al, 2004 ; Wassmann et al, 2004 ; Haleng et al, 2007).

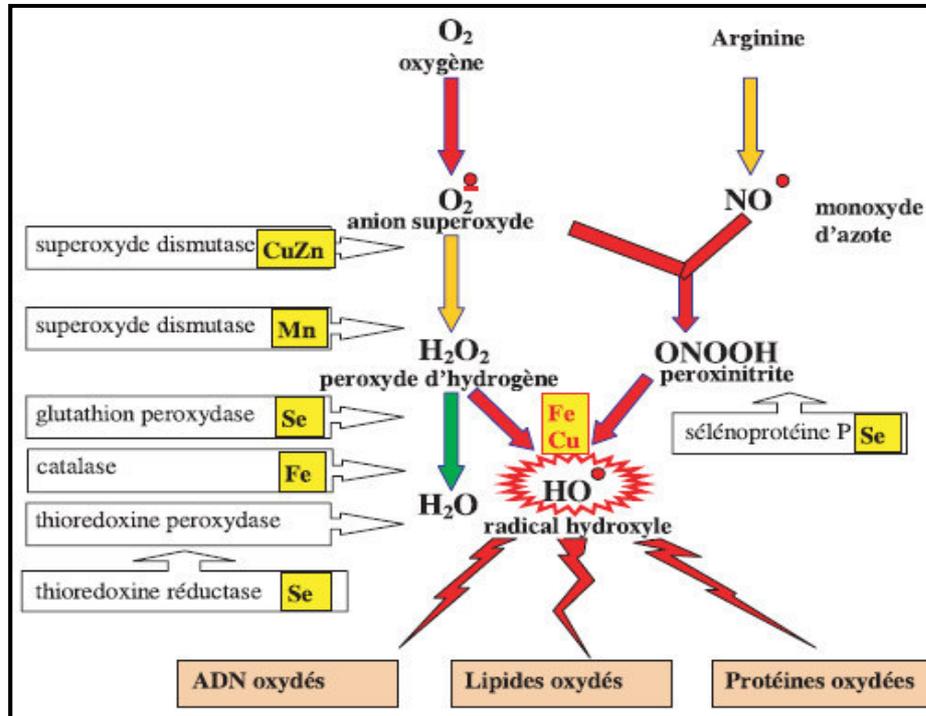


Figure 7 : Mode d'action des principaux systèmes enzymatiques antioxydants et de leur cofacteur métallique (Favier, 2003)

1.6.1 Système de défense enzymatique

1.6.1.1 Les superoxydes dismutases

Les superoxydes dismutases sont des métalloprotéines qui représentent l'une des premières lignes de défense contre le stress oxydant, elles catalysent la dismutation de l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) en le transformant en peroxyde d'hydrogène et en oxygène ; cette réaction se déroule principalement dans le cytoplasme et consomme deux molécules d'anions superoxydes.



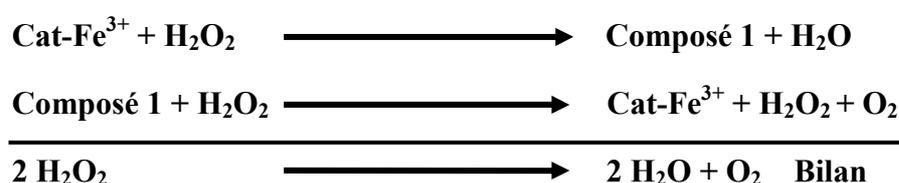
Il existe trois isoformes de la SOD, citons, la SOD à Cuivre et à Zinc (Cu,Zn-SOD) présente majoritairement au niveau cytoplasmique et est exprimée dans toutes les cellules avec une activité plus importante au niveau du foie, du cerveau, des neurones et des érythrocytes, la SOD à Manganèse (Mn-SOD) exclusivement retrouvée dans les mitochondries des cellules de différents organes : le cœur, les reins, le foie et le cerveau, et la

SOD à Fer (Fe-SOD) présente chez les procaryotes uniquement (Delattre et al, 2003 ; Haleng et al, 2007 ; Borg et Reeber, 2008).

1.6.1.2 Catalase (CAT)

La catalase est une enzyme héminique, c'est-à-dire qu'elle possède un atome de Fer qui participe à la fabrication de l'hème. Sa masse molaire moléculaire est de 220 000 Da. La CAT possède 4 sous unités comprenant chacune un atome de Fer sous forme Fe^{3+} .

Elle est localisée dans les peroxysomes et majoritairement retrouvée dans les hépatocytes, les érythrocytes et les cellules rénales. Cette enzyme est capable de transformer le peroxyde d'hydrogène en molécule d'eau et oxygène moléculaire selon les réactions ci-après (Borg et Reeber, 2008) :



1.6.1.3 Glutathion peroxydase (GSH-Px)

D'un point de vue structural, le glutathion peroxydase est une séléno-protéine constituée de quatre sous unités protéiques comportant un atome de Sélénium dans chaque sous unité ; elle est présente dans le cytoplasme et la mitochondrie des eucaryotes. Le mécanisme catalytique comporte une réduction d'une molécule de peroxyde d'hydrogène en présence de deux molécules de glutathion réduit (GSH) et elle est transformée en deux molécules d'eau et glutathion oxydé (GSSG). Une réaction similaire permet aussi la réduction d'hydroperoxyde lipidique (ROOH) en alcool (ROH) (Haleng et al, 2007).



Par ailleurs, afin de maintenir le rapport GSH/GSSG constant dans la cellule, le glutathion réductase intervient pour régénérer le glutathion par oxydation concomitante du NADPH fourni par la voie des pentoses phosphate selon la réaction ci-dessous (Delattre et al, 2003)



1.6.1.4 Glutathion réductase

La glutathion réductase (GR) appartient à la famille des flavoprotéines. Elle catalyse la réduction du glutathion oxydé (GSSG) en glutathion réduit (GSH) en utilisant du NADPH provenant de la voie des pentoses phosphates.



1.6.1.5 Glutathion-S-transférase

La Glutathion-S-transférase (GST) est une enzyme cytosolique présente dans de nombreux tissus (muscle, intestin, foie, rein). Elle catalyse la réaction de conjugaison du GSH réduit avec les xénobiotiques afin de les rendre plus hydrosolubles. En effet, Il existe 5 isoformes cytosoliques de la GST: ($\alpha, \mu, \pi, \vartheta, \theta$), dont les trois premières isoformes sont les plus fréquentes (Desmots et al. 2001).

1.6.2 Système antioxydant non enzymatique

On classe ces systèmes antioxydants selon qu'ils sont hydrosolubles, assurant une protection des milieux intra et extracellulaires ou liposolubles agissant au niveau des membranes et des lipoprotéines circulantes (Collard, 2014).

1.6.2.1 Antioxydant hydrosoluble

a) Glutathion

Le glutathion est un tripeptide (acide glutamique-cystéinyl-glycine) ubiquitaire produit dans différents tissus (Figure 8). Il est le thiol majoritaire au niveau intracellulaire où il est présent soit sous sa forme réduite (GSH) à une concentration intracellulaire de 0,1 à 1 mM, soit sous sa forme oxydée (GSSG) à des concentrations dix fois moins importantes. Un rapport GSH/GSSG élevé est essentiel pour assurer une protection contre le stress oxydant (Li, 2013 ; Valko et al. 2006)

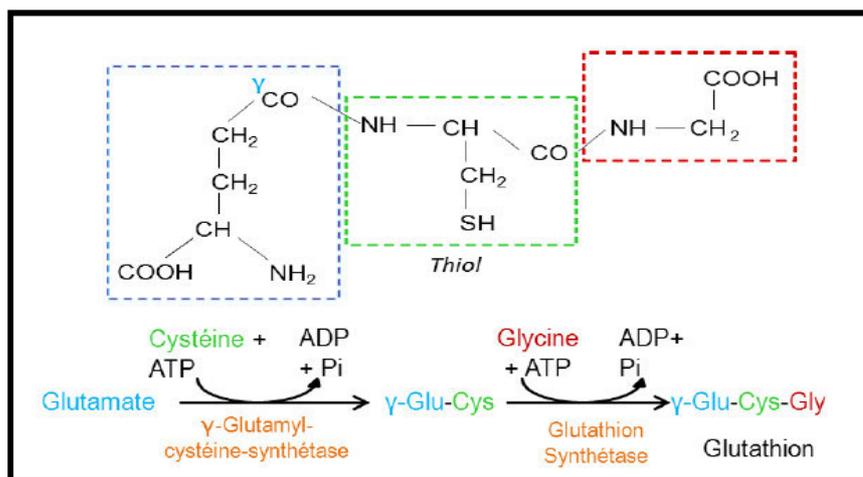


Figure 8 : Synthèse de glutathion (Dickinson et Forman, 2002)

En effet, Le groupement thiol permet au glutathion d'intervenir dans de nombreuses réactions de réduction. Il participe également aux réactions de détoxification des EROs, notamment H₂O₂ et aussi lors de la détoxification des xénobiotiques (Campbell, 2006).

Il intervient aussi comme chélateurs des métaux de transition et régénérateur final des vitamines C et E à partir de leurs formes radicalaires (Haleng et al, 2007).

b) Vitamine C

La vitamine C ou acide ascorbique agit principalement comme un agent réducteur et représente un excellent piègeur des espèces réactives de l'oxygène (OH^\bullet , $\text{O}_2^{\bullet-}$, RO_2^\bullet), en réagissant avec ces dernières, l'acide ascorbique est alors oxydé en acide déshydroascorbique. En outre, il agit en synergie avec la vitamine E en permettant sa régénération ; il contribue aussi au bon fonctionnement du système immunitaire, du métabolisme du fer ainsi que dans la synthèse du collagène et des globules rouges (Apfelbaum, 1981 ; Campbell, 2006).

c) Polyphénols

Les polyphénols constituent une famille importante d'antioxydants ; et ils sont des excellents piègeurs des ERO (en cédant un atome d'hydrogène à des radicaux RO_2^\bullet et RO^\bullet lors de la peroxydation lipidique) et de très bon chélateurs des métaux de transition (fer et cuivre). Ils ont ainsi un rôle bénéfique vis-à-vis de certaines pathologies cardiovasculaires ou de cancers (bruneton, 1993 ; Damianaki et al. 2000 ; Haleng et al, 2007 ; Ding et al. 2013).

1.6.2.2 Antioxydant liposolubles

a) Vitamine E

Le composant majeur de la vitamine E est l' α tocophérol, qui est synthétisé par les plantes et est connu par son caractère hydrophobe lui permettant de s'insérer au sein des membranes riches en acides gras polyinsaturés. En effet, les êtres humains ne peuvent pas en synthétiser, son apport se fait donc exclusivement via l'alimentation (les huiles végétales, les noix, les graines). En outre, lors d'une oxydation, l' α tocophérol constitue l'une des premières lignes de défense, réagissant avec les radicaux peroxy (ROO^\bullet) pour former un radical tocophéryle empêchant ainsi la propagation de la peroxydation lipidique (bruneton, 1993 ; Salvayre et Salvayre, 2005).



b) Caroténoïdes

Les caroténoïdes et plus particulièrement le Beta carotène d'origine naturelle présents entre autres dans les carottes (β carotène) et le melon (lycopène). Les caroténoïdes sont de puissants agents antiradicalaires qui neutralisent tant des espèces électroniquement que chimiquement actives. Grâce à leurs richesses en double liaisons, ils sont capables de piéger l'oxygène singulet et les radicaux peroxy en protégeant ainsi les lipoprotéines (LDL) (Delattre et al, 2003).

c) Coenzyme Q

Le coenzyme Q ou Ubiquinone appartient à la chaîne de respiration mitochondriale et permet le transport d'électrons des complexes I et II vers le complexe III. Il est également présent dans les lipoprotéines où il a un effet anti-oxydant. C'est un composé liposoluble ce qui lui confère une capacité de se déplacer au sein de la partie hydrophobe de la membrane interne. Il est présent à raison d'environ 0.3 molécule par particule de LDL, constituant la première ligne de défense lors d'une oxydation étant donné que le coenzyme Q est le seul anti-oxydant liposoluble endogène, ainsi il a un rôle protecteur contre le processus d'athérosclérose (Audigié et Zonszain, 1995 ; Delattre et al, 2003 ; Campbell, 2006).

1.6.2.3 Oligoéléments

Les oligoéléments tels que (Zinc, Sélénium, Manganèse) sont des métaux ou des métalloïdes contenus dans le corps, parfois à toutes petites doses, ils sont présents à une teneur inférieure à 1 mg/Kg du poids corporel. En outre, ils sont indispensables au bon fonctionnement de l'organisme et servent ainsi comme cofacteurs aux enzymes antioxydants (SOD, CAT, GPx). Le sélénium est l'un des constituants importants de la défense antioxydante, c'est un agent anti-mutagénique et possède également une fonction de détoxification des métaux lourds dont le cadmium (Nys, 2001). Alors que le zinc protège des groupements thiols de certaines protéines contre l'oxydation due au fer (Prasad 2009). Des apports insuffisants en oligoéléments seraient ainsi susceptibles de réduire les capacités de défense antioxydantes de l'organisme.

CHAPITRE III : OLIGOTHERAPIE SELENIUM - ZINC

1. Sélénium

1.1 Définition

Le sélénium tire son nom du grec « seléné » qui signifie « lune ». Sa découverte est due à J.J Berzelius et J.J Gahn en 1817 dans les sous produits de la fabrication de l'acide sulfurique (H_2SO_4) (Neve, 1991 ; Abdur et Huang, 2015). Le sélénium, tient une place importante parmi les oligoéléments auxquels on s'intéresse le plus actuellement. Il représente un des micronutriments essentiels pour la majorité des espèces vivants y compris l'être humain (Kolsteren, 1992).

1.2 Propriétés physico-chimiques

Le sélénium est un métalloïde de symbole chimique Se, analogue chimique du soufre. Il est situé dans la colonne VI de la classification périodique des éléments chimiques, son nombre atomique 34 et sa masse atomique égale à 78.96.

Dans le milieu naturel, il existe sous quatre états d'oxydation représentés dans le Tableau (2), dont les formes sélénites (SeO_3^{2-}) et sélénates (SeO_4^{2-}) sont les plus fréquents. Ces deux formes anioniques sont très solubles, mobiles, biodisponibles et potentiellement toxique, le séléniate étant relativement soluble est susceptible de formé des composés organiques comme: Sélénocysteine, Sélénométhionine, Diméthylsélénure, Diméthyldisélinure. (Adam et Roussel Debat, 2002 ; Bonnard et al, 2011).

Le sélénium est une substance livrée en poudre ou en morceau, solide, stable et insoluble dans l'eau, qui ne s'oxyde pas à température ordinaire, en effet, les températures de fusions et d'ébullitions sont respectivement ($221^\circ C$, $655^\circ C$) (Neve, 1991; Lauwerys, 2007).

**Tableau 2 : Propriétés physico-chimiques du sélénium et ses composés
(Bonnard et al., 2011)**

Nom	Masse molaire	Solubilité	T° Fusion	Aspect
Sélénium (Se)	79	acide sulfurique	170-221	Poudre
Sélénure d'hydrogène H_2Se	81	hydrosoluble	-65.7	Gaz incolore
Sélénite de sodium Na_2SeO_3	172.9	hydrosoluble	710	Solide hygroscopique
Séléniate de sodium Na_2SeO_4	188.9	hydrosoluble	/	Solide sous forme de cristaux blancs

1.3 Source et utilisations

1.3.1 Source :

L'apport du sélénium chez l'homme et chez les animaux vient principalement de la nourriture, puis de l'eau. En effet l'apport nutritionnel recommandé de sélénium pour l'adulte est de 55µg par jours (Dodig et Cepelak, 2004). Le sélénium se retrouve en majeure partie sous forme organique, il est présent en abondance dans les viandes, les poissons et les autres produits de la mer ; par contre, il est présent en faible quantité dans les fruits, légumes, produits laitiers et les matières grasses (Neve, 1991). En effet, l'acide aminé sélénocystéine ne provient pas de l'alimentation, il est synthétisé in vivo dans l'organisme. En effet il existe environ 25 type de sélénoprotéines chez l'homme, dont la répartition est mentionnée dans le Tableau (3).

Tableau 3 : les différents sélénoprotéines ayant un rôle biologiques connu (Thérond, 2003)

Sélénoprotéines		Fonctions
Glutathion peroxydase	Cytosolique (GSHPx-1)	Enzymes antioxydantes : lignes de défense contre les agressions des radicaux libres de l'oxygène
	Gastro intestinale (GSHPx-2)	
	Plasmatique ou extracellulaire	
	Membranaires hydroperoxyde phospholipide (GSHPx-4)	
Désiodases	5 DI	Régulation des hormones thyroïdiennes
	5DII	
	5DIII	
Thiorédoxine réductases	TR1	Régénération des systèmes anti-oxydants et maintien de l'état d'oxydoréduction intracellulaire
	TR2	
	TR3	
Sélénoprotéine P		protection des cellules endothéliales de la peroxydation
Sélénoprotéine oxydoréductase		Régénération de la GSH oxydée, de la thiorédoxine oxydée.
Sélénoprotéine 15kDa		Protège les cellules épithéliales prostatiques par une activité GSH
Sélénoprotéine R		Méthionine R sulfoxyde réductase
Sélénophosphate synthétase 2		Précurseur de la sélénocystéine
Sélénoprotéine W		Fonction musculaire

1.3.2 Utilisation

Le sélénium et ses composés ont diverses applications à l'échelle industrielle ainsi que dans le domaine médical. A l'industrie, le sélénium est utilisé dans les technologies de la photocopie moderne, il est utilisé aussi dans la fabrication des verres (40 %). En outre, en métallurgie, l'addition de sélénium à l'acier améliore sa machinabilité, sa résistance à la corrosion et sa finesse de surface (Duvoid, 1999 ; Lauwerys, 2007 ; Bonnard et al, 2011). En revanche, en médecine il est utilisé comme photoconducteur dans les radiographies par rayons X, grâce à sa sensibilité à la lumière. Le sélénium et plus particulièrement le Sélénométhionine est utilisé pour calculer la demi-vie des plaquettes et du fibrinogène, dans l'exploitation de la fonction parathyroïdienne, dans l'exploration du pancréas, ainsi que pour calculer le turn-over des protéines (Duvoid, 1999).

1.4 Métabolisme du sélénium

1.4.1 Absorption

En milieu professionnel, la pénétration du sélénium dans l'organisme se fait par voie respiratoire (inhalation, vapeur, poussière), digestive (déglutition des particules inhalées) et plus accessoirement cutanée (Shackleton et al, 1992). Cependant, les composés solubles du sélénium sont aisément absorbés par les poumons et le tractus gastro-intestinal et plus particulièrement par le duodénum (varie de 44 à 95 % de la dose ingérée). Les mécanismes biochimiques de résorption dépendent de la forme chimique du sélénium ingéré. En effet, les formes organiques comme la sélénométhionine semblent mieux résorber que les formes inorganiques (Sélénite et Sélénate).

1.4.2 Distribution

Chez l'homme ainsi que chez l'animal, le sélénium, après absorption, sera transporté par les érythrocytes, l'albumine et les globulines plasmatiques, dont l'albumine semble être le récepteur immédiat et sert de transporteur vers les sites de fixation tissulaire, en particulier, le foie (15 %) et les reins (5 %) dont ils fixent spécifiquement le sélénium (Thomson et Stewart, 1974). Les deux formes de sélénium, que ce soit organique, ou inorganique sont facilement métabolisées par le glutathion à diverses formes de métabolites de sélénium (sélénopersulfure et séléniures) qui sont des intermédiaires nécessaires à la synthèse des dérivés enzymatiques tels que (la glutathion peroxydase). Voir figure 9.

Cependant, l'incorporation du sélénium dans les protéines s'effectue par plusieurs manières : la sélénométhionine est incorporée d'une façon aléatoire dans les protéines à la

place de la méthionine, tandis que la sélénocystéine est incorporée dans un acide ribonucléique de transfert (tARN) spécifique (Neve, 1991 ; Tinggi, 2008).

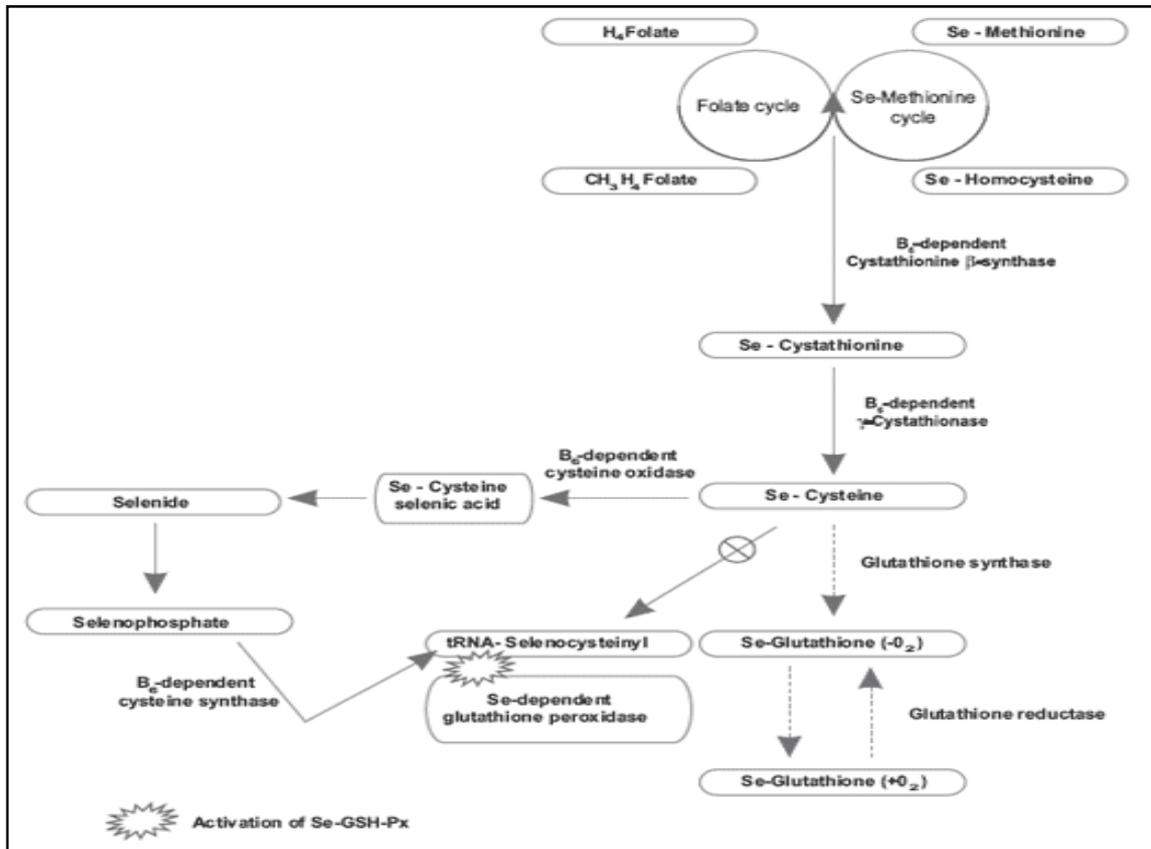


Figure 09 : Voie métabolique du Sélénium (Tingi, 2008)

1.4.3 Excrétion

Le taux d'élimination n'est pas influencé par la dose, mais il augmente avec le taux du sélénium alimentaire. La voie urinaire représente la voie principale d'excrétion avec un taux de 60 % sous la forme d'ion triméthylsélénonium qui est hydrosoluble, elle est suivie par la voie fécale avec un taux de 35 %. Cette dernière contient la partie d'élément non résorbée et des formes provenant des sécrétions intestinales. En cas d'apport élevé, le sélénium est transformé en diméthylsélieniure (composé volatil) et excrété par voie pulmonaire donnant l'odeur d'ail, de l'haleine indiquant ainsi une intoxication (Bonnard et al, 2002 ; Neve 1991, Tinggi, 2008).

1.5 Rôle physiologique

En générale, le sélénium possède plusieurs activités dont l'une est essentielle, il s'agit de l'activité antioxydante. De plus, il est régulateur du métabolisme de la thyroïde (catalyse la transformation de la thyroxine T4 en T3, laquelle est la forme hormonale active au niveau

tissulaire), protecteur contre certain formes de cancer et intervient dans le processus immunologique ; il augmente la fertilité masculine et régule les médiateurs de l'inflammation dans l'asthme (Simonoff & Simonoff, 1991 ; Lauwerys, 2007).

D'autre part, le sélénium est incorporé sous sa forme active (sélénocystéine) au niveau du site actif de nombreuses sélénoprotéines dont :

a) Glutathion peroxydase :

La glutathion peroxydase est formée de 4 sous-unités identiques contenant chacune un atome de sélénium, sous forme de sélénocystéine. Les glutathions peroxydases sont des enzymes antioxydantes qui inhibent la production des radicaux libres liés à l'oxygène et luttent contre le stress oxydatif. Ces enzymes peuvent agir en synergie avec les autres molécules antioxydantes pour retrouver l'équilibre entre système oxydants-antioxydants, comme la superoxyde dismutase ou la catalase ou non enzymatique comme la vitamine E, C, les caroténoïdes, les composés avec des groupements thiols ; Cette fonction permet le maintien de l'intégrité membranaire, réduit la propagation des lésions oxydatives supplémentaires sur les lipides, les protéines ou l'ADN, pour limiter le risque associé de pathologies (Thérond, 2003 ; Ducros et Favier, 2004).

b) Thioredoxine réductase :

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

c) Iodothyronine déiodinase :

Les iodothyronine 5'-déiodinases étant essentielles pour la production de l'hormone thyroïdienne active 3,5,3'-triiodothyronine (catalyse la 5-5' mono-déiodination de la pro hormone thyroxine T4 en forme thyroïdienne active T3), certains effets de la carence du sélénium provoquent des manifestations thyroïdiennes plutôt que d'une incapacité de métaboliser les peroxydes (Marshall, 2005).

d) Sélénoprotéine P :

Principalement localisée dans le plasma dont les fonctions sont peu définies, dont la Sel-P agirait comme antioxydant des cellules endothéliales en réduisant les peroxynitrites (ONOO-) (Navarro-Alarcon et Cabrera-Vique, 2008). Elle permet de maintenir de l'homéostasie à la suite du transport dans les différents organes, marquant également une activité peroxydase spécifique des phospholipides (Burk et al., 2003) ,

1.6 Carence en sélénium

Un déficit en sélénium résulte principalement d'une consommation insuffisante. (Zheng, 2007). La dose létale (DL50) est fixée chez l'homme entre 500 mg et 1 g de sélénium sous forme minérale (sélénite ou sélénate de sodium). La dose journalière la plus basse entraînant des signes de toxicité (une chute des cheveux et des ongles, un état dépressif et de la fatigue) se situe aux environs de 2400 et 3000 µg (Thérond et al., 1997).

La déficience en sélénium a été également associée au développement endémique de la maladie de Keshan (cardiomyopathie juvénile) ainsi que de la maladie Kashin-Beck (pathologie musculo-articulaires) (Lauwerys, 2007 ; Navarro-Alarcon et Cabreva-vique, 2008).

1.7 Toxicité du sélénium

Le sélénium provoque rarement des intoxications chroniques ou aiguës, par l'alimentation chez l'homme. Tout d'abord, l'intoxication aiguë orale varie selon la solubilité des composés du sélénium. Les plus solubles (Sélénite de sodium et Séléniate de sodium) sont les plus toxiques, les symptômes et manifestations observés sont localisés au niveau du système nerveux central (faiblesse musculaire, perte de vigilance), au niveau du foie par nécrose hépatique, et au niveau des reins par congestion rénale suivie d'une hémorragie, dermatite et perte de poils et augmentation du taux sérique d'hémoglobine et d'hématocrite.

De plus, l'exposition chronique au sélénium provoque une déshydratation du corps et des lésions hépatique, pancréatique et splénique, associées à des symptômes non spécifiques tels que l'asthénie, l'irritabilité, la perte du poids, très fréquemment des troubles gastro-intestinaux avec nausée, vomissement, diarrhée et d'autres symptômes évocateurs d'intoxication comme l'odeur alliacée d'haleine, la sueur, le goût métallique dans la bouche et enfin la modification des phanères (ongles cassants, striés ou mous) (Barceloux, 1999).

2. Zinc

2.1 Définition

Le mot « zinc » dérive de l'ancien allemand « zinke », qui signifie pointe acérée ou dent, du fait de la forme de certaines particules du zinc. Après le fer et le magnésium, le zinc est l'oligoélément le plus quantitativement important dans notre organisme, il est présent à une concentration de 2-4 g/Kg de poids corporel chez l'organisme humain. Il agit comme cofacteur enzymatique dans de nombreux processus métaboliques de l'être humain (Seve et Favier, 2002).

Il se trouve principalement dans les globules rouges, où il est nécessaire à l'action de l'anhydrase carbonique. Cette dernière catalyse la conversion du dioxyde de carbone (CO_2) en bicarbonate (HCO_3^-) dans les tissus, qui sera transporté par les érythrocytes aux poumons (Pelmont, 2005 ; Schlegel, 2010 ; Bilandzic et al, 2014).

2.2 Propriétés physico-chimiques

Le zinc se situe dans le groupe XII de la classification périodique des éléments chimiques et porte le numéro atomique 30. Le zinc est le métal de transition, caractérisé par une bonne conductivité électrique, il est présent dans les molécules organiques, essentiellement sous forme de cation divalent (Zn^{2+}). Ce dernier s'associe facilement avec l'oxygène et les éléments non métalliques tels que, les peptides, les acides aminés et les nucléotides afin de former des complexes tetramériques (Seve and Favier, 2002).

2.3 Source et utilisation

a) Source

Les besoins en zinc sont estimés à 15 mg par jour chez l'adulte et à 12 mg par jour chez la personne âgée (plus de 75 ans). L'apport du zinc est garanti chez l'homme essentiellement grâce aux éléments de provenance animale tels que la viande, le fromage dur, les abats et les crustacés, formant de bonne sources de zinc, en revanche, il est présent en quantité notable dans les céréales, les légumineuses telles que les lentilles et grains de soja, les noix et les amandes (Buhrer-Astfalk, 2011).

En effet, la biodisponibilité du zinc de source animale est nettement meilleure que celle du zinc de source végétale. De sorte que l'utilisation du zinc de source végétale est gênée par des facteurs inhibiteurs de la résorption intestinale tels que l'acide phytique (présent dans les céréales, les légumineuses, les noix et les graines) et divers autres types de fibres (cellulose, hémicellulose et lignine), formant en particulier avec le zinc des composés insolubles (phytates) (Schelgel, 2010).

De plus, il existe autres facteurs qui peuvent influencer la résorption du zinc. En effet, le cuivre comme le fer exerce un effet compétitif sur l'absorption du zinc ; avec le cuivre, les apports alimentaires entraînent rarement des doses nécessaires à l'apparition de cet effet. Alors que le fer est un vrai antagoniste, cette interaction apparaît pour les formes minérales de fer, mais pas avec le fer de l'hémoglobine.

Parmi les facteurs stimulants l'absorption du zinc on note : lactose, vin, EDTA, ligand du zinc dans le lait, protéines animales, acides aminés (histidine, cystéine), acides organiques (citrate) et peptides (Seve and Favier, 2002).

b) Utilisation

La consommation annuelle mondiale de zinc est d'environ 11 millions de tonnes, dont 50 % sont principalement utilisés pour galvaniser l'acier, le protégeant ainsi contre la corrosion, et environ 20 % sont destinés à la fabrication de laiton en alliage avec le cuivre. L'oxyde de zinc (ZnO) est généralement utilisé dans la production des peintures, cosmétiques, médicaments, produits plastiques, textiles et équipements électriques, tandis que le sulfate de zinc (ZnSO₄) est utilisé dans la production de peintures, d'ampoules fluorescentes et d'écrans (Schelgel, 2010).

2.4 Métabolisme du zinc**a) Absorption**

L'absorption du zinc se fait au niveau de l'intestin grêle et plus précisément au niveau du jéjunum. Lors d'un repas, le zinc semble être capté au niveau de la bordure en brosse de l'épithélium digestif par des acides aminés (cystéine). Dans la cellule intestinale, le zinc rejoint le pool de zinc labile dont une partie va se fixer sur des enzymes ou des protéines membranaires. L'autre partie va, soit se déplacer vers la membrane basolatérale pour aller dans le sang, soit se fixer à des protéines de petit poids moléculaire : les métallothionéines. Ces dernières sont des protéines qui favorise la captation du zinc intracellulaire et limitent son transfert vers le milieu intérieur, ainsi ils contrôlent la biodisponibilité des métaux essentiels comme le cuivre et le zinc et modulent la toxicité des métaux lourds comme le cadmium (MT) (Chappuis, 1991).

b) Distribution

Le zinc est transporté par voie sanguine, principalement lié à l'albumine (65 %), fermement à l'alfa 2 macroglobuline (30 %) et à 5 % avec d'autres protéines (transferrine et céruloplasmine). Le zinc plasmatique lié à l'albumine représente la source principale pour alimenter les tissus en zinc, en premier lieu le foie, puis les autres organes producteurs d'enzymes et de protéines. Le foie représente un tissu de stockage et de détoxification dont il capte entre 30 à 40 % du zinc plasmatique nouvellement absorbé. Les autres tissus de stockage sont respectivement les tissus musculaires (60 %), le squelette (30 %) et les 10 % restants se trouvent distribués dans les érythrocytes, les enterocytes, les cellules épithéliales, les reins, les poumons, le cœur et le cerveau (Imoberdorf et al, 2010 ; Schelgel, 2010 ; Bengra, 2014).

c) Excrétion

L'excrétion endogène fécale est la principale voie de sortie des métabolites du zinc (90 %) ; par contre, elle est de 10 % par voie urinaire, tandis que des quantités minimes sont éliminées par la transpiration, la peau, les cheveux, le sperme et les sécrétions menstruelles (Imoberdorf et al, 2010). selon (Schelgel, 2010), le flux corporel du zinc est montré dans la Figure 10.

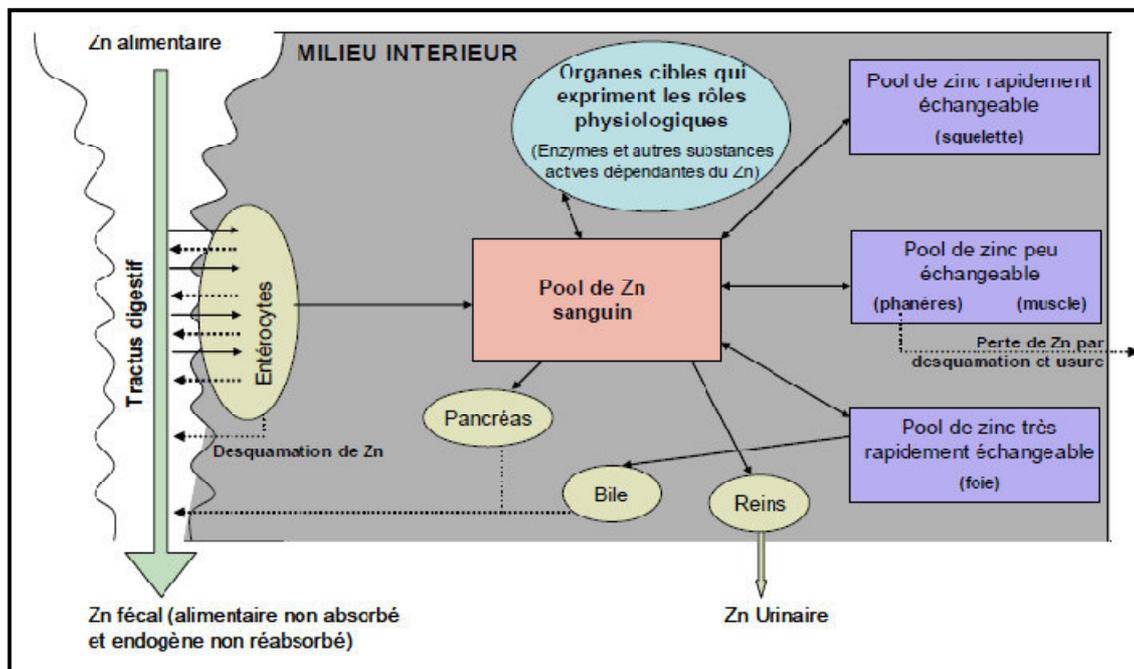


Figure 10 : Flux corporel du zinc (Schelgel, 2010)

2.5 Rôle physiologique

Le zinc participe à de nombreux processus biologiques au sein de l'organisme (Frausto Da saliva et Williams, 1991) :

a) Activation enzymatique (catalytique)

L'oligo-élément est présent dans plus de 200 métalloprotéines et métalloenzymes enzymes des classes oxydoréductases, transférases, hydrolases, lyases, isomérases et ligases, ce qui lui confère de nombreux rôles physiologiques. A travers ces différentes enzymes, le zinc joue un rôle dans la plupart des fonctions biologiques, principalement la défense oxydative des membranes cellulaires, la défense immunitaire, la réplication et la transcription de l'ADN pour la croissance, le développement et la prolifération cellulaires, la synthèse des protéines, des lipides et des glucides, et la détoxification cellulaire (Nys, 2001 ; Schelgel, 2010). En effet, il est peut être directement impliqué dans la réaction catalytique induite par

l'enzyme. Le zinc va catalyser des réactions de déshydrogénation ou de déshydratation. De même, le métal peut rentrer dans la stabilisation de la structure de la protéine : on parle de rôle structural.

b) Régulation du système nerveux

Le cerveau contient une teneur élevée en zinc. Il existe une barrière homéostatique régulant les taux cérébraux de zinc au niveau des plexus choroïdes. Ce pool de zinc est distribué dans le cerveau antérieur (cortex et structures limbiques) et notamment dans l'hippocampe ; régions destinées aux fonctions d'apprentissage et de mémoire. Au niveau cellulaire, il est présent dans les terminaisons axoniques de nombreux neurones excitateurs du système nerveux central (SNC) : on parle de « neurones zincergiques ». Il va s'accumuler dans les vésicules pré-synaptiques des neurones glutaminergiques. Son mécanisme d'action n'est pas exactement défini, mais le zinc pourrait agir comme neurotransmetteur et neuromodulateur des récepteurs glutaminergiques et aurait un effet sur l'humeur (Bengra, 2014).

c) Défense immunitaire

Le zinc est nécessaire pour le fonctionnement normal de la défense immunitaire et oxydative, ce rôle du zinc s'explique par son implication dans le développement cellulaire de la moelle épinière (synthèse des leucocytes), c'est un agent mitogène des lymphocytes T et un cofacteur de nombreux médiateurs (lymphokines, transferrine, thymuline). La thymuline permet la maturation des lymphocytes T, et stimule les fonctions immunitaires T dépendantes comme la toxicité allogénique, la fonction suppresseur et la production d'interleukine 2 (Seve et Favier, 2002 ; Schelgel, 2010 ; Bengra, 2014).

d) Métabolisme osseux

Le zinc joue un rôle important dans le métabolisme osseux en tant que cofacteur de métallo-enzymes ; comme la phosphatase alcaline est nécessaire à la calcification et la collagénose, nécessaire à la résorption et au remodelage osseux. Le zinc interagit avec des hormones impliquées dans la croissance osseuse telles que la somatomédine C, la testostérone, les hormones thyroïdiennes et l'insuline (Bengra, 2014).

e) Inflammation

Le zinc permet la synthèse des prostaglandines et des leucotriènes, en activant la phospholipase A2, la lipo-oxygénase et la cyclo-oxygénase d'où son importance dans la réaction inflammatoire.

f) Défense antioxydant

Le zinc est un antioxydant important, en effet, il possède une action anti-radicalaire directe sur la formation du radical hydroxyle. Il peut aussi s'opposer aux réactions non enzymatiques catalysées par le fer (Réaction de Fenton) produisant le radical hydroxyle. De même, le zinc stabilise les membranes en se couplant aux groupes thiol et leur évite de réagir avec le fer. Il maintient une concentration élevée en métallothionéines, riches en groupe SH, ce qui équivaut à une fonction piègeur de radicaux libres (Seve and Favier, 2002).

2.6 Carence du zinc

Elle est retrouvée chez environ deux milliards de personnes : notamment, dans les pays du tiers monde où les céréales sont la principale source de nourriture. De plus, il n'est pas facile de consommer la quantité suffisante de zinc dans notre alimentation : nous n'absorbons que 20 à 40 % de zinc dans les aliments (soit 8 à 10 mg par jour) et de nombreuses associations interfèrent au niveau de l'absorption (calcium, phosphore, cuivre et fer (Seve et Favier, 2002).

Les symptômes cliniques d'une carence en zinc consistent en une détérioration généralisée d'un ensemble de fonctions liées aux rôles des différentes enzymes contenant du zinc. Une carence en zinc réduit ainsi la capacité de défense immunitaire et de défense oxydative des cellules par le dysfonctionnement progressif des activités enzymatiques de la défense des hétérophiles ou neutrophiles et des macrophages (Seve and Favier, 2002 ; Schelgel, 2010 ; Bilandzic et al, 2014).

2.7 Toxicité du zinc

Le zinc est également un élément toxique lorsqu'il est administré à forte dose. La dose létale est estimée à une concentration corporelle de 100 mg/Kg (Schelgel, 2010). En effet, La consommation excessive du zinc (225 à 450 mg) provoque des douleurs abdominales, des nausées, des vomissements, de la fièvre et des vertiges, mais aussi, des troubles gastro-intestinaux peuvent se manifester à des doses journalières de 50 à 150 mg de zinc. Ces troubles sont plus fréquents quand le zinc est administré sous forme de sels, plutôt que sous forme chélatée (Chappuis, 1991 ; Imoberdorf et al, 2010 ; McRae et al, 2016). En outre, la prise chronique de 25 à 50 mg de zinc par jour peut réduire la résorption du cuivre (par un effet antagoniste), mais aussi elle est à l'origine d'une augmentation de la fraction LDL-Cholestérol et une diminution de la fraction HDL-Cholestérol, et compromet ainsi le système immunitaire (Seboussi et al, 2004 ; Imoberdorf et al, 2010 ; Bilandzic et al, 2014).

CHAPITRE IV : PHYTOTHERAPIE

1. Généralités sur la phytothérapie

L'Algérie, pays connu pour sa biodiversité, dispose d'une flore particulièrement riche et variée. On compte environ 3000 espèces de plantes dont 15% endémique et appartenant à plusieurs familles botaniques. L'utilisation des plantes pour la médication date de la préhistoire, et revient à la mode depuis quelques années dans les pays occidentaux. Elle constitue également un des fondements de la médecine populaire en Afrique et en Amérique du Sud, dont la connaissance et l'utilisation thérapeutique, basées sur l'analyse et l'observation, s'appelle la phytothérapie (Damintoti, 2005 ; Delille, 2010).

Le mot phytothérapie provient du grec « **phyton** », qui signifie « plante » et « **therapein** », qui signifie « soigner ». La phytothérapie correspond donc à l'usage des plantes médicinales en thérapeutique (Roy, 2004).

1.1 Utilisation des plantes médicinales

Dans la phytothérapie, la prise des plantes médicinales peut se faire sous différentes formes avec conservation de leur différents principes actifs et ce, pour éviter toute décomposition. Elle peut être sous forme de gélules, comprimés, infusion, teintures alcooliques, crème, pommades, extrait de plante brut ou sous d'autres formes comme des lavements ou des applications sous forme de cataplasme (Larrey, 2005).

Pour éviter toute détérioration des principes actifs des plantes, un procédé récent a été mis en place, c'est le cryobroyage qui consiste à broyer finement les plantes fraîches sous une température basse (-196 °C) en utilisant l'Azote liquide (Nelly, 2013).

1.2 Métabolites secondaires des plantes

On désigne par « métabolite secondaire » toutes molécules organiques complexes synthétisées et accumulées en petites quantités par les plantes autotrophes, et qui ne participe pas directement aux processus de base de la cellule vivante. Chez les végétaux, ces métabolites regroupent plusieurs dizaines de milliers de différentes molécules, rassemblées en superfamilles chimiques telles que les composés aromatiques (polyphénols), les alcaloïdes, les terpènes et stérols, les hétérosides et les huiles essentielles (Guignard et al, 1985; Bourgaud, 2013).

1.2.1 Les composés aromatiques (polyphénols)

La biosynthèse d'un composé aromatique est un des processus fondamentaux de la phytochimie ; Les polyphénols sont des produits du métabolisme secondaire des végétaux, caractérisés par la présence d'au moins d'un noyau benzénique auquel est directement lié au

moins un groupement hydroxyle libre, ou engagé dans une autre fonction tels que : éther, ester, hétéroside...etc. (Bruneton, 1999 ; Lugasi et al., 2003). Les polyphénols sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs : racine, tiges, feuilles, fleurs, fruits parmi les composés aromatiques les plus importants, on distingue les flavonoïdes, les tanins, les quinones et les bétalaines (Guignard et al, 1985, Bougandoura et Bendimerad, 2012).

a) Flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des substances très répandues chez les végétaux ; on les trouve dissoutes dans les vacuoles à l'état d'hétérosides. Ces glucosides renforcent les parois des capillaires et améliorent les échanges de l'oxygène entre le sang et les tissus (Dellile, 2010). Les flavonoïdes proviennent de l'addition de trois groupements en C₂ avec l'acide p-hydroxycinnamique, conduisant à deux noyaux benzéniques. Selon le degré d'oxydation de cette chaîne, on distingue un grand nombre de variétés de flavonoïdes (figure 11) tels que les anthocyanes, les proanthocyanidoles, les flavonoles, les rétinones et les rétinolides.

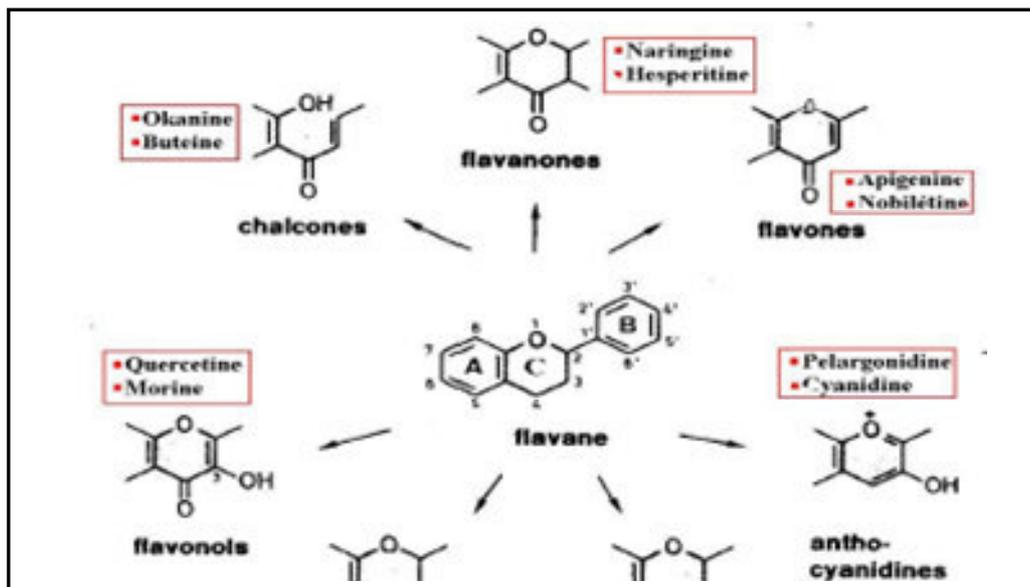


Figure 11 : Différents types de flavonoïdes à partir du squelette flavane (Bruneton, 1999)

Les flavonoïdes possèdent deux différents rôles selon (Guignard, 1985) on distingue:

- **Rôle physiologique** : de nombreux flavonoïdes, en raison de leur richesse en groupe phénol, sont capables de se fixer sur certaines protéines et enzymes, en modifiant ainsi les équilibres enzymatiques ; ils interviendraient à différents stades de développement, notamment lors de la germination.
- **Rôle biologique** : les flavonoïdes participent au processus de pollinisation et de dispersion en donnant leurs couleurs aux fleurs et fruits ; les flavonoïdes, qui

imprègnent le bois, ont des propriétés fongicides et insecticides, en protégeant l'arbre contre l'intrusion des champignons ou des insectes.

Les flavonoïdes sont aussi considérés comme de bons chélateurs d'ions métalliques (Brown, 1998 ; Dacosta, 2003), comme les ions du fer (Fe^{2+}) et du cuivre (Cu^+) qui sont essentiels pour certaines fonctions physiologiques, mais ils sont aussi responsables de la production du radical hydroxyle par la réduction du peroxyde d'hydrogène selon la réaction suivante :



b) Tanins

Les tanins sont des substances polyphénolique de structure variée, de saveur astringente ayant en commun la propriété de tanner la peau, cette aptitude est lié à leur propriété de se combiner aux protéines. Leur poids moléculaire est compris entre 500 et 3000 Da (Paris et Hurabielle, 1981).

On distingue deux types de tanins, les tanins hydrolysables ou tannoïdes (polymères d'acide gallique) et les tanins vrais, non hydrolysables (polymères de certains flavonols). Généralement, les tanins ont la propriété de coaguler les protéines du derme, ils précipitent également les protéines de la salive, ce qui correspond à leur action astringente. Ils possèdent en outre des propriétés antiseptiques, antibiotiques, anti-inflammatoires, anti diarrhéiques, hémostatiques et vasoconstrictrices (Guignard et al, 1985; Dellile, 2010).

c) Quinones

Les quinones appartiennent aux benzoquinones, aux naphthoquinones et aux anthraquinones, ils sont des composés irritant qui possèdent un effet fréquemment répulsif, c'est le cas des dérivés anthracéniques aux propriétés irritantes sur le tube digestif vis-à-vis des herbivores (Guignard, 1985).

1.2.1 Alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des composés organiques azotés et basiques, exclusivement d'origine végétale, dont la molécule renferme au moins un atome d'azote, le plus souvent dans un hétérocycle (Figure 12). Tous les alcaloïdes ont plusieurs rôles pharmacologiques notamment au niveau du système nerveux central, autonome et du système cardiovasculaire. Ils sont des hallucinogènes (morphine), anesthésiques locaux (cocaïne), anti tumoraux et antiparasitaires (Guignard et al, 1985 ; Ghestem et al., 2001 ; Dellile, 2010).

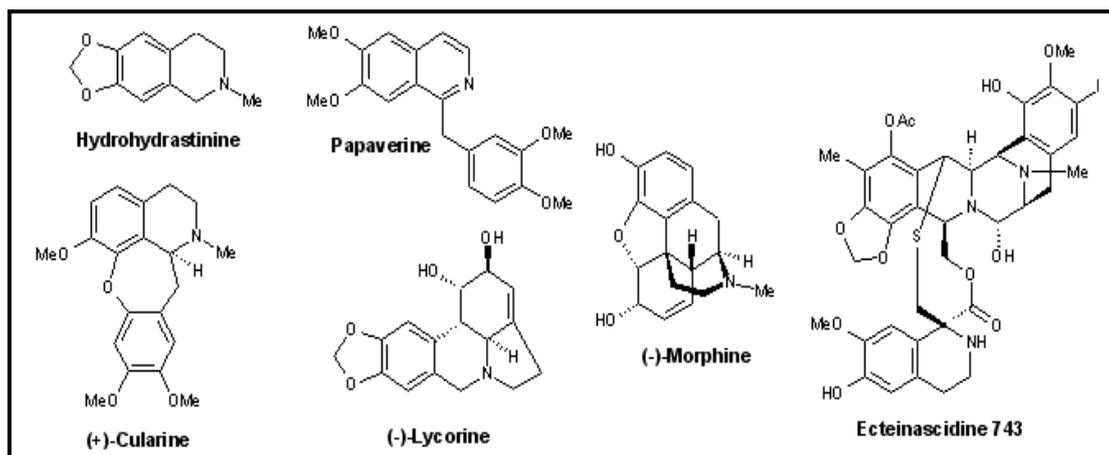


Figure 12 : Différents composés d'alcaloïdes (Mann et al., 1994)

1.2.2 Terpènes

Les terpènes sont des composés organiques lipidiques, dérivant de la polymérisation de plusieurs molécules d'isoprènes ; leur synthèse a lieu au niveau du réticulum endoplasmique. Selon (Guignard et al, 1985), on en distingue plusieurs types tels que: les mono terpènes (sesquiterpènes), les diterpènes, les triterpènes (stéroïdes) et les tétraterpènes : généralement sous forme de caroténoïdes.

1.2.3 Huiles essentielles

Les huiles essentielles (HE) sont des composés volatiles, optiquement actifs, d'odeur caractéristique, elles se forment dans un grand nombre de plante comme sous produit du métabolisme secondaire. Elles sont synthétisées par les cellules sécrétrices des plantes aromatiques, et se trouvent dans différentes parties : dans les feuilles (basilic), dans les fleurs (rose), dans le fruit (citron, orange), dans les graines (coriandre), dans l'écorce (cannelle) et dans les racines (ail) (Dellile, 2010 ; Saihi, 2011).

2. *Artémisia campestris*

L'*Artemisia* appartient à la famille des Astéracées, c'est l'un des genres le plus répandus et le plus étudiés de cette famille, il comporte plusieurs centaines d'espèces (400) distribuées largement dans les pays de la région méditerranée, l'Afrique du Nord et l'Amérique du Sud, le Nord Ouest et le Sud Ouest Européen. La flore Algérienne contient environ 13 espèces d'*Artemisia* y compris l'*Artemisia campestris* (Degouft) (Ghorab et al, 2013 ; Humara et al, 2014 ; Al-sanafi, 2015).

Les espèces qui appartiennent au genre *Artemisia* possèdent des propriétés thérapeutiques grâce a leur richesse en flavonoïdes, tanins, coumarines, huiles essentielles, stéroïdes et terpènes ; elles sont non seulement utilisées dans la médecine traditionnelle, mais

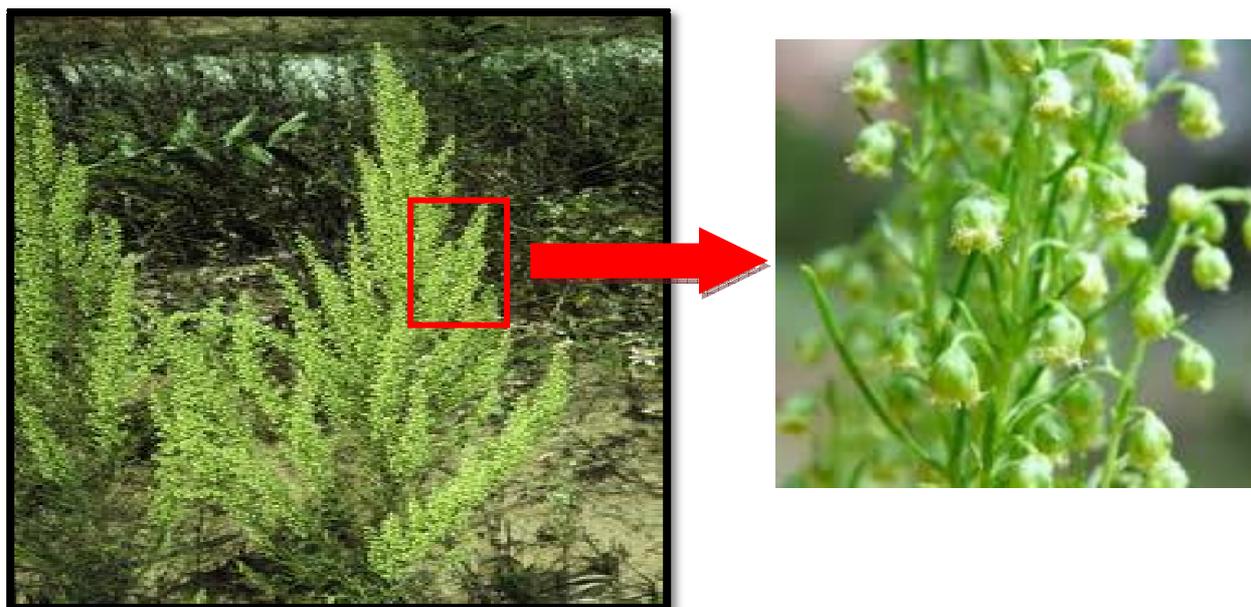
aussi dans l'industrie alimentaire et pharmaceutique (Mirjalili et al., 2007 ; Kundan et Anupam., 2010).

2.1 Habitat et présentation de la plante

Artemisia campestris est une plante qui pousse dans les hauts plateaux Algériens, surtout dans les pâturages semi-arides. Pour des besoins de recherche, nous l'avons collectée le mois de septembre 2011 dans la région de El'Aouinette (Wilaya de Tébessa), sa partie aérienne est nettoyée et séchée, puis laissée à l'abri de la lumière dans un endroit sec et aéré jusqu'au moment de son utilisation.

Artemisia campestris aussi appelée Armoise rouge, est une plante vivace, à tige couchée ou ascendante, pouvant atteindre 60 cm de hauteur. Ses feuilles sont glabres, d'un vert foncé avec des rameaux rougeâtres, à capitule conique ou ovale, elle est caractérisée par une odeur agréable et une saveur amère due à sa forte composition de mono-terpènes (Dellile, 2010).

2.2 Systématique botanique



**Figure 13 : Photo d'*Artemisia campestris* station El-Aouinette (Tébessa).
Photos prise par Barkat, (2015)**

Selon (Caratini, 1971), la plante *Artemisia campestris* est classée in :

Règne: Plantae

Sous règne: Tracheobionta

Embranchement: Spermatophyta

Sous embranchement: Magnoliophyta

Classe: Magnoliopsida

Sous classe: Asteridae

Ordre: Asterales

Famille: Asteraceae

Sous famille: Asteroideae

Genre: *Artemisia*

Espèce: *Artemisia campestris*

Nom arabe : *Degoufte, Tgouft, Alala, Tagoug, Chaal*

Nom français : *Armoise champêtre, Armoise des champs, Armoise rouge*

Nom Anglais: *Field Sagenort, Sagewort, wormwood*

2.3 Composition chimique

De nombreuses études chimiques ont révélé que la partie aérienne d'*Artemisia campestris* est riche en métabolites secondaires tels que les polyphénols, les flavonoïdes, les tanins, les huiles essentielles (Juteau et al., 2002).

La composition chimique de l'huile essentielle varie selon le chimiotype considéré, ainsi que selon la phase de développement de la plante. L'huile essentielle est analysée par la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-MS) (Bruneton, 1999 ; Jerkovic et al., 2003). D'après Ghorab et al (2013) les constituants les plus abondants d'*Artemisia campestris* récolté d'une région de l'Algérie sont (16.47% β myrcene, 8.15% α cymen, 14.18% α pinene, 12.61% β ocimene et 5.85% camphore), ces constituants représentent plus de 40 % de l'huile totale.

Les flavonoïdes identifiés chez *Artemisia campestris* sont: flavone (apégénine), flavonol (kaempférol 7-méthyle), flavanone (naringénine), dihydroflavonols (taxifoline-7-méthyle) (Valant et al., 2003).

2.4 Propriétés thérapeutiques

Artemisia campestris est une plante utilisée depuis longtemps dans la médecine traditionnelle, dont la partie aérienne possède des propriétés thérapeutiques et pharmacologiques à savoir: antispasmodique, antihémorragique, cicatrisante, acaricide, antivenimeuse, hypoglycémiant, anti-inflammatoire, antibactérienne et dans le traitement de l'obésité par diminution du taux de cholestérol (Ghorab et al, 2013 ; Al-snafi, 2015 ; Asmaa et al, 2015). Dans le Nord Ouest Européen, cette espèce végétale est utilisée comme ingrédient important dans les boissons alcoolisées ainsi que dans les boissons amères. Elle est également utilisée en parfumerie et dans une gamme d'applications alimentaires (Saihi, 2011).

2.5 Activités biologiques

2.5.1 Activité antioxydante

La partie aérienne d'*Artemisia campestris* possède des activités antioxydantes significatives en inhibant la production de l'anion superoxyde, l'hydroxyle, ainsi que la peroxydation lipidique au niveau des microsomes (Bruneton, 1999).

Dans une étude faite par Akrouf et al., (2011), qui ont étudié l'activité antioxydante de trois extraits de la partie aérienne d'*Artemisia campestris* (huile essentielle, extrait aqueux, extrait éthanolique 50%) en utilisant trois méthodes différentes: la méthode de DPPH, la technique du β -carotène et la méthode d'ABTS (2,2 azinobis-3-ethylbenzthiazoline-6 sulphonic acid), ils ont trouvé que l'huile d'*Artemisia campestris* possède une faible activité antioxydante, alors que les extraits aqueux et organique montrent une activité antioxydante importante en comparaison à celle de l'huile essentielle.

2.5.2 Activité hypoglycémiant

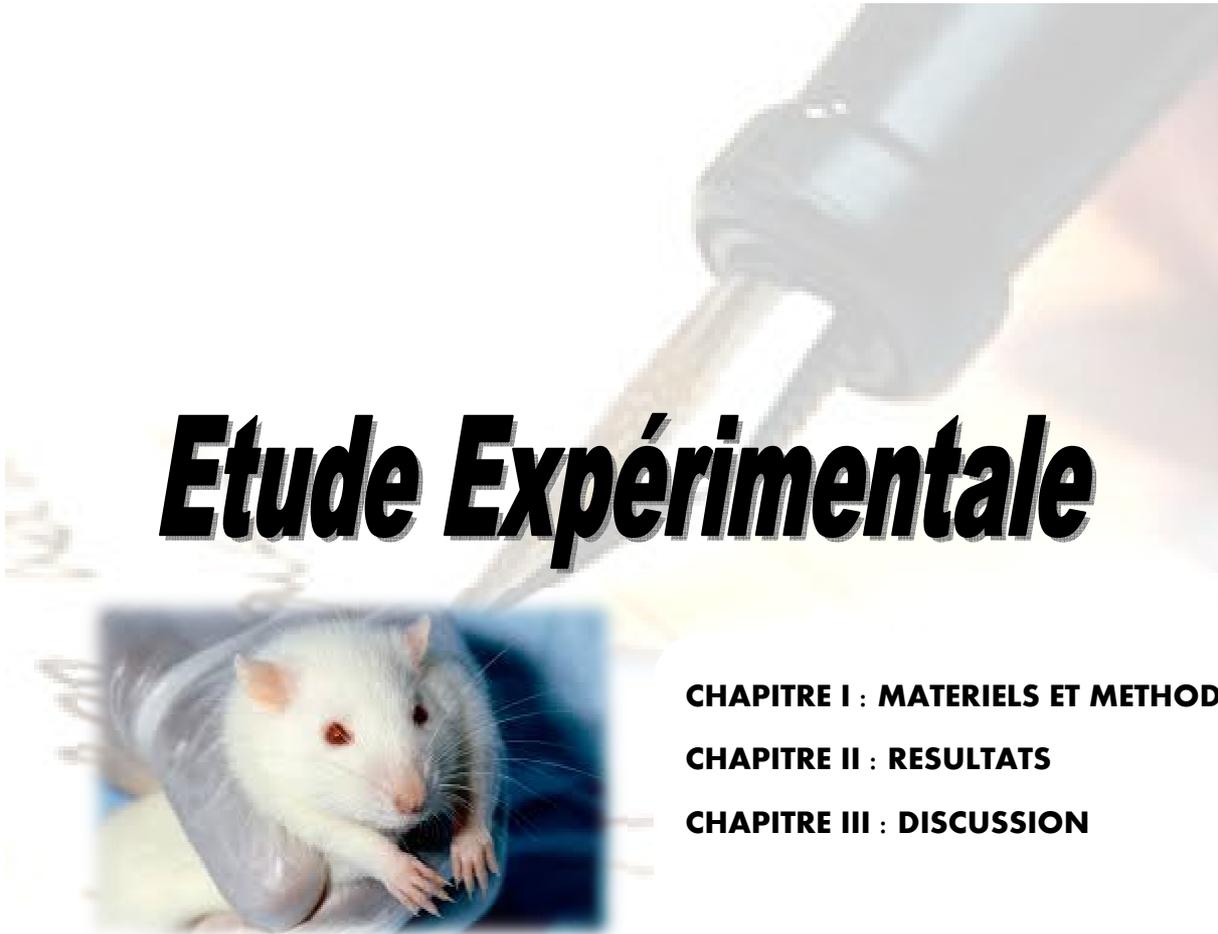
Artemisia campestris possède des propriétés hypoglycémiantes, selon Séfi et al (2010) l'extrait aqueux d'*Artemisia campestris* d'une part, diminue le taux de glucose dans le plasma des rats chez lesquels le diabète est induit par l'alloxane monohydrate et d'autre part augmente le niveau de l'insuline, ce qui peut prévenir les complications du diabète.

2.5.3 Activité antibactérienne

Artemisia campestris est une plante médicinale utilisée dans le traitement de nombreuse infection, elle possède des propriétés antibactérienne et antifongique. Selon Naili et al (2010), l'activité antibactérienne de l'extrait méthanolique des feuilles d'*Artemisia campestris* est plus efficace contre les bactéries gram positif (*Staphylococcus aureus*) que les bactéries gram négatif (*Escherichia coli*).

D'après Akrouf et al (2007) l'huile essentielle d'*Artemisia campestris* est moins active pour l'ensemble des bactéries, en comparaison a celle de l'extrait aqueux et organique. Par contre, dans l'étude de Bensassi et al (2007) les résultats montrent que l'extrait d'acétone est le seul qui confirme une action inhibitrice contre trois types de bactéries: *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus* et *Staphylococcus aureus* comparativement aux autres extraits (méthanol, acétate éthyle, chloroforme).

En outre *Artemisia campestris* possède des propriétés antifongiques, Kyeong et ses collaborateurs (2007) ont étudiés l'effet antifongique de l'extrait aqueux des racines d'*Artemisia campestris* sur des champignons de mycorhize, les résultats obtenus montrent que l'extrait aqueux possède un potentiel antifongique.



Etude Expérimentale

CHAPITRE I : MATERIELS ET METHODES

CHAPITRE II : RESULTATS

CHAPITRE III : DISCUSSION

CHAPITRE I : MATERIEL ET METHODES

1. Etude phytochimique

1.1 Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé est constitué de l'extrait aqueux de l'*Artemisia campestris* (AC), cette dernière a été récoltée pendant la période de sa floraison (septembre 2011) de la région d'El-Aouinette (Wilaya de Tébessa). Une quantité de la plante submentionnée est nettoyée puis séchée à l'air libre à l'abri de la lumière pendant 20 jours.

1.2 Préparation de l'extrait aqueux d'*Artemisia campestris*

La drogue (5 g) est infusée dans 1 litre d'eau bouillante pendant 15-20 min, après refroidissement, l'extrait aqueux est récupéré, dans un premier temps, après filtration à l'aide d'un papier filtre. Ensuite, le mélange est éliminé du filtrat par lyophilisation, permettant ainsi d'obtenir un résidu caractérisé par une couleur verdâtre. Lequel est ensuite conservé par congélation (-4°C) jusqu'au moment de l'analyse phytochimique.

1.3 Screening des composés phénolique d'*Artemisia campestris*

1.3.1 Mise en évidence des flavonoïdes

La présence des flavonoïdes est qualitativement déterminée dans le but d'obtenir une couleur rose orangée ou violacée. En effet, on ajoute à 5mg de résidu, 5ml d'acide chlorhydrique dilué deux fois (1 ml HCl concentré + 4 ml d'EtOH) et deux ou trois copeaux de Magnésium.

1.3.2 Mise en évidence des tanins

À 5 mg de résidu, on ajoute 15 ml de réactif de Stéasny, ensuite le mélange est chauffé au bain marie 80°C pendant 30 min. L'apparition d'un précipité gros flocon indique la présence des tanins catéchiques. Dans un deuxième temps, en ce qui concerne les tanins galliques à 5 mg de résidu, on ajoute goutte à goutte 1 ml d'une solution de chlorure ferrique (FeCl_3) ; l'apparition d'une coloration bleue noire intense confirme l'analyse.

1.3.3 Mise en évidence des stérols et terpènes

À 5 mg de résidu, on ajoute successivement 1 ml d'acide acétique (CH_3COOH) et 0.5 ml d'acide sulfurique concentré (H_2SO_4). La présence des stérols et des terpènes est indiquée par l'apparition d'un anneau pourpre ou marron, devenant gris par la suite.

1.3.4 Mise en évidence des cardénolides

À 5 mg de résidu, on ajoute 1.5 ml d'acide acétique (CH_3COOH) et quelques gouttes d'une solution de chlorure ferrique (FeCl_3), plus 0.5 ml d'acide sulfurique (H_2SO_4). L'apparition d'une coloration verte bleue indique la présence des cardénolides.

1.3.5 Mise en évidence des saponosides

Dans un tube à essai, on ajoute à 2mg de résidu, 1ml d'H₂O. On agite fortement le tube avec le contenu dans le sens horizontale pendant 15secondes. L'apparition d'une mousse persistante, pendant 15minutes, indique la présence des saponosides.

1.4 Détermination quantitative des composés phénolique d'*Artemisia campestris*

1.4.1 Dosage des polyphénols totaux

a. Principe

Le dosage des polyphénols totaux a été effectué selon la méthode de Chen (2008), utilisant le réactif de Folin Ciocalteu. Ce dernier, est constitué par un mélange d'acidephosphotungstique (H₃PW₁₂O₄₀) et phosphomolibdique (H₃PMo₁₂O₄₀), il est réduit par les phénols en un mélange d'oxydes bleus de tungstène (W₈O₂₃) et de molybdène (Mo₈O₂₃), (Ribéreau-Gayon et al., 1972). Ce dernier est ainsi réduit par l'oxydation des phénols en un composé bleu.

b. Mode opératoire

Dans une série de tubes à hémolyse contenant 100µl de l'extrait aqueux, on ajoute 750µl de la solution de réactif de FolinCiocalteu dilué (x10), par la suite le contenu est agité vigoureusement et incubé à l'obscurité pendant 5 min, puis on ajoute 750µl d'une solution de bicarbonate de sodium (Na₂CO₃ : 60g/l), le mélange est ensuite incubé pour une deuxième fois à l'obscurité pendant 90 min à 22°C. Les absorbances à 725 nm ont été enregistrées.

c. Calcul de concentration

La teneur en polyphénols totaux est calculée selon l'équation de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique (0.2 mg/ml). Le résultat obtenu est exprimé en milligrammeéquivalent d'acide gallique par gramme d'extrait aqueux (mg GAE/g extrait) (Figure 14).

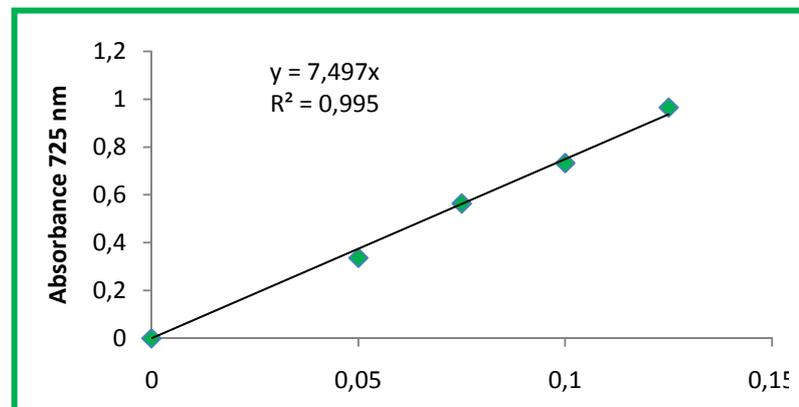


Figure 14 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique (0.2mg/ml)

1.4.2 Dosage des flavonoïdes totaux

a. Principe

Le dosage des flavonoïdes totaux est réalisé selon la méthode décrite par Djeridane et al, (2006). Il est basé sur la formation d'un complexe Aluminium-flavonoïde à l'aide d'un test colorimétrique utilisant le trichlorure d'aluminium $AlCl_3$.

b. Mode opératoire

A chaque 1 ml de l'extrait aqueux de la plante (1mg/ml), on ajoute 1 ml d' $AlCl_3$ (2%), le contenu est ensuite agité vigoureusement, puis incubé à l'obscurité pendant 10-15 min. L'absorbance de la réaction est mesurée par spectrophotomètre à 430 nm.

c. Calcul de la concentration

La teneur en flavonoïdes totaux est calculée à partir de l'équation de la courbe d'étalonnage de quercétine (0.1 mg/ml). Le résultat est exprimé en milligramme équivalent quercétine par gramme de l'extrait aqueux (QE/g extrait) (Figure 15).

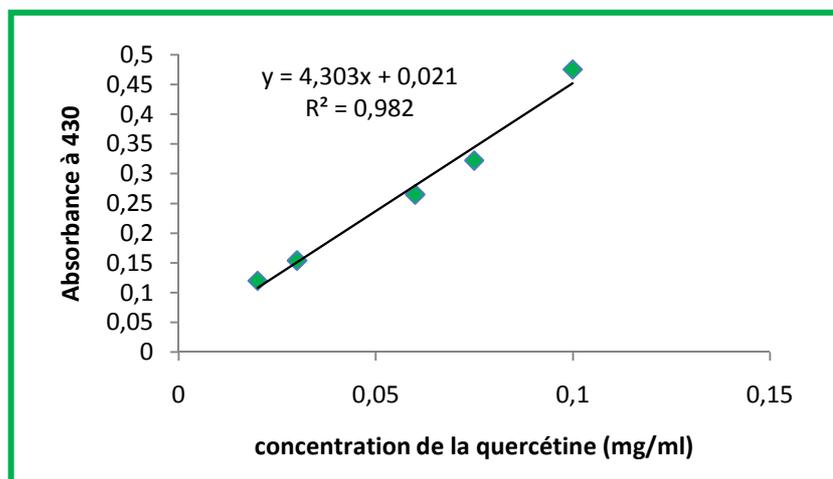


Figure 15: Courbe d'étalonnage de la quercétine (0.1mg/ml).

1.4.3 Dosage des tanins condensés

a. Principe

Le dosage des tanins condensés est effectué selon la méthode de Julkunen-Tiitto (1985), il est basé sur la réaction entre la vanilline et les composés flavonols libres, donnant une coloration rouge.

b. Mode opératoire

Dans une série de tubes à hémolyse contenant 50 μ l de l'extrait aqueux, on ajoute 3 ml de la solution vanilline (4%) préalablement préparée par le méthanol ; ensuite on ajoute

100 μ l d'HCl concentré. Les tubes sont ensuite incubés à l'obscurité à température ambiante pendant 20min. Les absorbances à 500 nm ont été enregistrées.

c. Calcul de la concentration

La teneur en tanins est calculée à partir de l'équation de la courbe d'étalonnage de catéchine. Le résultat obtenu est exprimé en milligramme équivalent de catéchine par gramme d'extrait aqueux (CE/g extrait) (Figure 16).

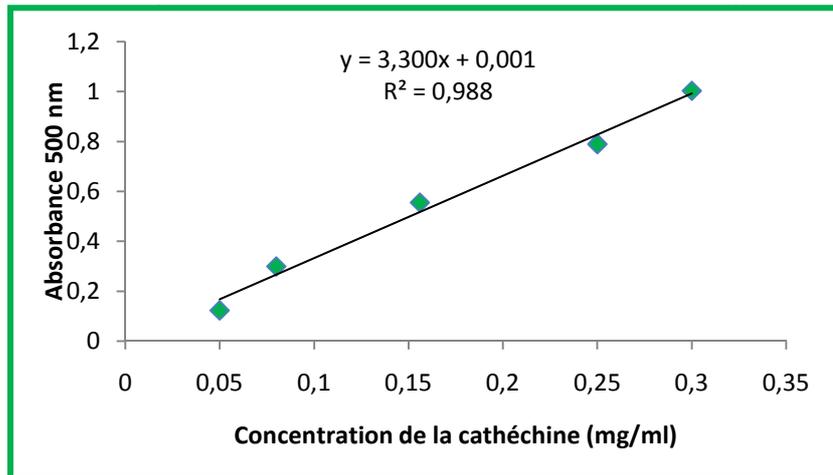


Figure 16 : Courbe d'étalonnage de la catéchine (0.3mg/ml).

1.5 . Evaluation de l'activité antiradicalaire

1.5.1 Test de DPPH

a. Principe

Le potentiel antiradicalaire est déterminé selon la méthode de Blois (1958), utilisant le 2,2-diphényl-1-picryl-Hydrazyl (DPPH), il est basé sur la réduction de ce dernier par un antioxydant formant un nouveau composé de coloration jaune (Figure 17).

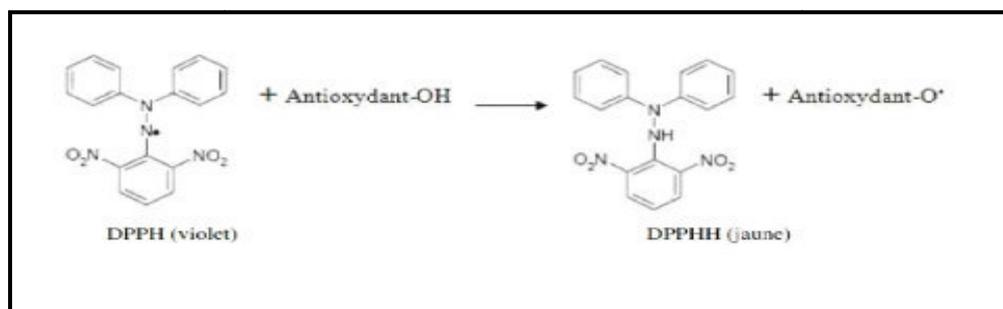


Figure 17 : Réaction de réduction de DPPH.

b. Mode opératoire

La solution de DPPH^{*} à 60 µM (2.36 mg dans 100 ml de l'éthanol absolu) est préparée à l'avance (au moins 1-2 heures) car la solubilisation est difficile et ne se conserve pas plus que 4-5 jours à -5°C et à l'obscurité. Des volumes de 0.5 ml de la solution à tester (à différentes concentrations : 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1) ont été mélangés avec la solution du DPPH^{*} (0.5 ml; absorbance de 0.68 ± 0.03 à 515 nm). Le mélange réactionnel est vigoureusement agité pendant 10 secondes. Le contenu est ensuite transféré dans des cuves de 2 ml et puis incubé dans la cavité du spectrophotomètre pendant 30 min. A des intervalles de temps réguliers, les absorbances à 520 nm ont été enregistrées contre le blanc éthanol sur un spectrophotomètre UV-VIS Bueco S-22.

c. Calcul du potentiel antiradicalaire

Le potentiel anti-radicalaire est déterminé la formule ci-après en tenant compte de l'IC50 qui représente la concentration de l'extrait aqueux qui exerce 50% d'inhibition des radicaux libres (DPPH).

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

1.5.2 Test de l'ABTS**a. principe**

En réagissant avec le persulfate de potassium ($K_2S_2O_8$), l'ABTS (acide 2,2'-azino-bis(3éthylbenz-thiazoline-6-sulfonique)) forme le radical ABTS^{•+}, de couleur bleue à verte. L'ajout d'antioxydant va réduire ce radical et provoquer la décoloration du mélange. La décoloration du radical, mesurée par spectrophotométrie à 734 nm, est proportionnelle à la concentration en antioxydant.

b. Mode opératoire

Des volumes de 10µl de la solution à tester (à différentes concentrations : 0.625, 0.125, 0.25, 0.5, 1) ont été mélangés avec la solution de l'ABTS (990µl, absorbance de 0.8 ± 0.03 à 734 nm). Le mélange réactionnel est vigoureusement agité pendant 10 secondes. Le contenu est ensuite transféré dans des cuves de 2 ml et puis incubé dans la cavité du spectrophotomètre pendant 10 min. A des intervalles de temps réguliers, les absorbances à 723 nm ont été enregistrées contre le blanc éthanol sur un spectrophotomètre UV-VIS Bueco S-22.

1.6 Extraction des huiles essentielles

a. Principe

L'hydrodistillation d'*Artemisia campestris* a été accomplie à l'aide d'un dispositif de type Clevenger (Figure 18). Ce système permet d'effectuer des prélèvements horaires sur les phases aqueuse et organique, destinés aux mesures de la cinétique d'hydrodistillation.

b. Mode opératoire

50 g de matière végétale sont placés dans 500 ml d'eau, le tout est chauffé pendant 4 h jusqu'à l'ébullition. La vapeur condensée obtenue conduit à une phase organique (huile essentielle) qui est séparée de l'hydrolat par décantation et à laquelle on ajoute du sulfate de magnésium ($MgSO_4$) pour éliminer les traces d'eau. La quantité d'essence obtenue est pesée pour le calcul du rendement :

c. Calcul de rendement

Le rendement d'une huile essentielle est défini comme étant le rapport entre la masse d'huile essentielle obtenue et la masse de la matière végétale utilisée. Le pourcentage du rendement est calculé à partir de la formule suivante :

$$R\% = \frac{PHE}{PMV} \times 100 (\%)$$



Figure 18 : Hydrodistillateur de type Clevenger

R : Rendement (%)

PHE : poids des huiles essentielles (g)

PMV : poids de matière végétale (g)

2. Matériel biologique

Dans notre expérimentation (mois de décembre 2011), nous avons utilisé 42 rats blancs males de type *Rattus rattus* de la souche Wistar provenant de l'Institut Pasteur (centre d'élevage d'El-Kouba, Alger), et ayant des poids corporels entre 270 g et 290 g.

Dès leur arrivé, les rats sont séparés dans des cages de polyéthylène tapissées d'une litière constituée de copeau de bois. Les cages sont nettoyées et la litière est changée tout les deux jours jusqu'à la fin de l'expérimentation. Les rats sont soumis à une période d'adaptation de deux semaines aux conditions de l'animalerie, à une température voisine de 25°C et une photopériode naturelle. Ils sont nourris avec un concentré équilibré (ONAB-El KseurBéjaia) dont la composition est indiquée dans le Tableau 4.

Tableau 4 : Composition de l'alimentation pour 1 Kg d'aliment (ONAB)

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

2.1 Traitement des rats

2.1.1 Expérimentation 1

Dans la première expérimentation, les rats sont répartis en 4 groupes de 7 rats chacun, il s'agit de :

- **Lot 1 (T)** : Témoin sain, les rats reçoivent 1 ml de l'huile de maïs par gavage chaque jour pendant une durée 28 jours.
- **Lot 2 (MD)** : Les rats reçoivent par gavage 1ml de méthidathion préalablement préparé avec l'huile de maïs, à raison de 5 mg/Kg de poids corporel chaque jour pendant une durée de 28 jours ; cette dose qui représente le 1/15 de la dose létale, et a été choisie selon les résultats des travaux de Sutcu et al.,(2006) et de Güney et al., (2007).
- **Lot 3 (Se+Zn)** : Les rats reçoivent du Sélénium sous forme de sélénite de sodium (Na_2SeO_3) administré par voie orale dans l'alimentation à raison de 1,5 mg/Kg de poids corporel (Goel et al., 2005; Ben Amara et al., 2011), et par le Zinc ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)

administré par voie orale dans l'eau de boisson à raison de 0.227 g/l (Mansour and Mossa, 2009).

- **Lot 4 (MD+Se+Zn):** Les rats reçoivent par gavage 1 ml de Méthidathion avec la même dose que celle du groupe 2 avec la supplémentation quotidienne de sélénite de sodium et du zinc avec les mêmes doses précédemment déterminées.

2.1.2 Expérimentation 2

Dans la deuxième expérimentation, les rats sont répartis en 4 groupes de 7 rats chacun. Les 1^{er} et 2^{ème} groupessont d'abord prétraités avec un régime standard tous les jours et pendant un mois, par contre, les 3^{ème} et 4^{ème} groupes ont reçu 5g/l d'extrait aqueux d'*Artemisia campestris*. Après 30 jours, les 4 groupes ont poursuivi le traitement ci-après :

- **Lot 1 (T) :** Témoin sain, les rats reçoivent 1 ml de l'huile de maïs par gavage chaque jour pendant une durée de 28 jours.
- **Lot 2 (MD) :** Les rats reçoivent par gavage 1 ml de méthidathion préalablement préparé avec l'huile de maïs, à raison de 5 mg/Kg de poids corporel chaque jour pendant une durée de 28 jours ; cette dose, qui représente le 1/15 de la dose létale, est choisi selon les résultats des travaux de Sutcu et al.,(2006) et de Güney et al., (2007).
- **Lot 3 (AC) :** les rats reçoivent par voie orale l'extrait aqueux d'*Artemisia campestris* à raison de 5 g/l chaque jour pendant 28 jours ; cette dose est choisi selon les résultats des travaux de Saoudi et al.,(2010) et de Séfi et al., (2011).
- **Lot 4 (MD+AC) :** les rats reçoivent par gavage 1 ml avec la même dose que celle du groupe 2, avec la supplémentation quotidienne de l'extrait aqueux d'*Artemisia campestris* (5g/l).

2.2 Sacrifice des rats et prélèvement des échantillons

2.2.1 Prélèvement sanguin

Après 28 jours de traitement, les rats sont sacrifiés par décapitation, le sang est immédiatement recueilli dans trois tubes étiquetés :

- Les tubes à EDTA serviront pour la détermination de la formule de numération sanguine (FNS).
- Les tubes secs sont centrifugés à 5000 tours/minute pendant 15 minutes, afin de récupérer le sérum, qui sera conservé à -18°C pour doser les paramètres biochimiques (urée, créatinine, cholestérol, triglycérides, lipides totaux, bilirubine totale et directe, phosphatase alcaline, transaminase ASAT/ALAT, lactate déshydrogénase et le fer sérique).

- Les tubes héparinés sont centrifugés à 5000 tours/minute pendant 15 minutes, afin de récupérer le plasma qui sera conservé à -18°C pour doser les hormones (T3, T4, et la Testostérone).

2.2.2 Prélèvement des organes

Une dissection abdominale longitudinale est effectuée pour le prélèvement des différents organes (foie, reins, cerveau et testicules). Une fois débarrassés de leurs tissus adipeux, les organes sont rincés avec une solution de chlorure de sodium (NaCl à 0,9%) puis pesés. Un fragment de foie et de rein de chaque groupe de rat sont séparément fixés dans le bouin alcoolique afin de réaliser des coupes histologiques, le reste des organes sont conservés au congélateur à -20°C pour le dosage des paramètres du stress oxydant (GSH, MDA, GPx, GST, CAT).

Les figures 19 et 20 ci-après, illustrent les différentes étapes des protocoles expérimentaux réalisés dans les deux expérimentations.

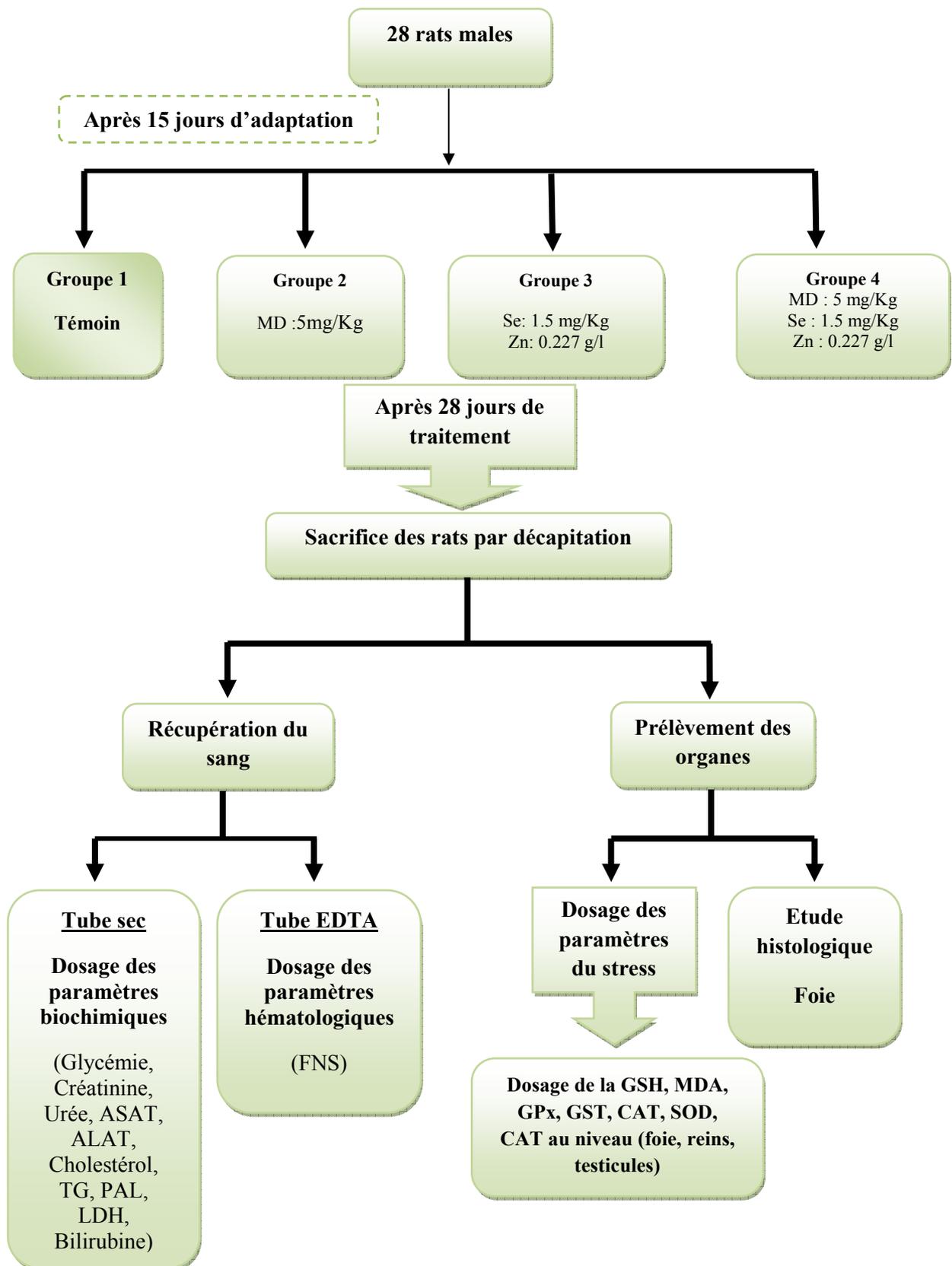


Figure 19 : Schéma récapitulatif de la première expérimentation

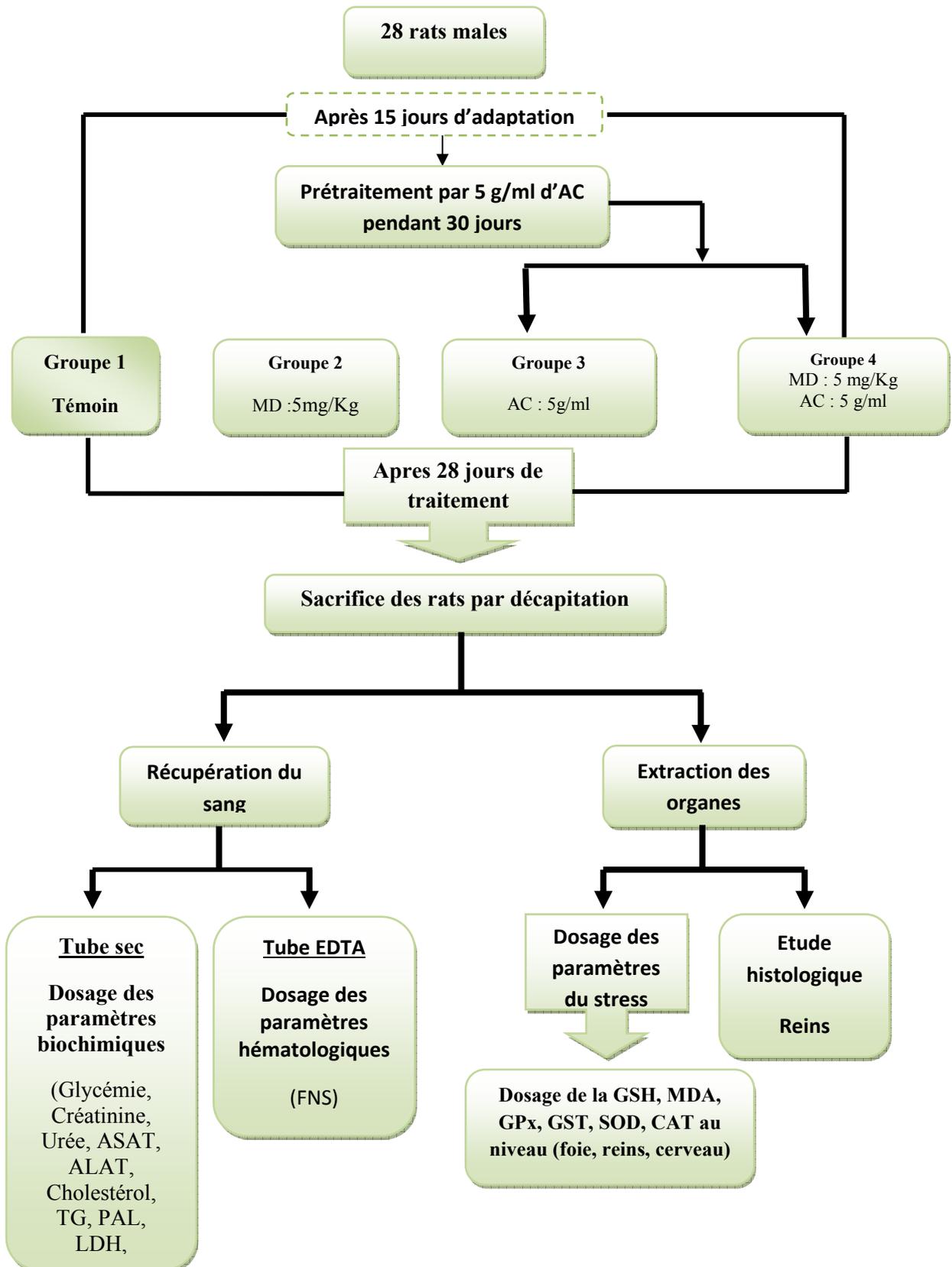


Figure 20 : Schéma récapitulatif de la deuxième expérimentation

3 Techniques de dosages

3.1 Détermination de la formule de numération sanguine (FNS)

La formule de numération sanguine (FNS) est réalisée par un automate de type « Selectra E », les paramètres ainsi déterminés sont : globule rouge (GR), globule blanc (GB), hémoglobine (Hb), hématocrite (HT), plaquettes (PLT), lymphocytes (LY), monocytes (MO), volume globulaire moyen des hématies (VGM) et la concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (CCMH).

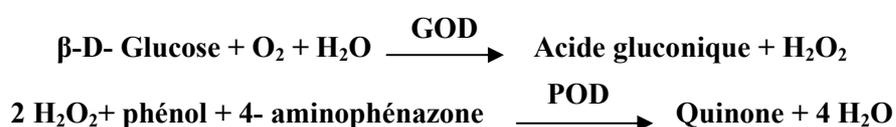
3.2 Dosage des paramètres biochimiques

Tous les dosages des paramètres plasmatiques sont effectués selon les fiches techniques spécifiques à chaque paramètre à l'aide d'un Kit provenant de Spinreact.

3.2.1 Dosage de glucose

➤ Principe

Le glucose est transformé par le glucose oxydase en acide gluconique avec libération du peroxyde d'hydrogène H_2O_2 qui réagit sous l'action d'une peroxydase avec le phénol et le 4-aminophénazone pour former la 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 ;Trinder, 1969).



➤ Mode opératoire

Réactifs	Blanc	Etalon	Echantillon
Réactif (ml)	1.0	1.0	1.0
Etalon (μl)	-	10	-
Echantillon (μl)	-	-	10
H ₂ O distillé (μl)	10	-	-

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

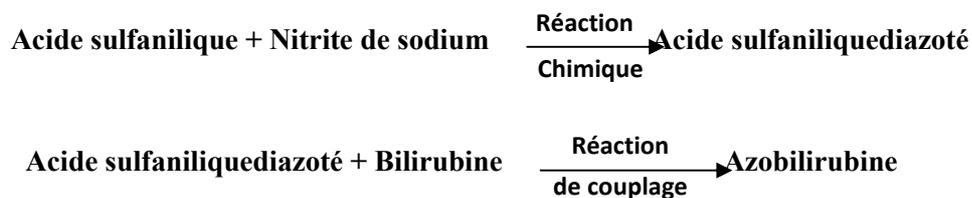
➤ **Calcul de la concentration**

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

3.2.2 Dosage de la bilirubine totale ou directe

➤ **principe**

La bilirubine est définie comme la quantité de pigment biliaire dans le plasma réagissant avec l'acidesulfaniliquediazoté à pH acide pour produire l'azobilirubine selon les reactionssuivantes:



Cette analyse est instantanée avec la bilirubine directe (la bilirubine conjuguée), par contre avec la bilirubine totale (bilirubine non conjuguée), elle est indirecte et nécessite la solubilisation par le diméthylsulfoxyde (DMSO) (En absence de DMSO, seule la bilirubine directe réagit). L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration de la bilirubine dans l'échantillon (Kaplan et al., 1984).

➤ **Mode opératoire**

Réactif	Blanc	Blanc T	Blanc	Blanc D
R1 (ml)	-	-	1.5	1.5
R2 (ml)	1.5	1.5	-	-
R3 (µl)	-	50	-	50
Echantillon (µl)	100	100	100	100
H ₂ O distillé (µl)	50	-	50	-

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

➤ **Calcul de la concentration**

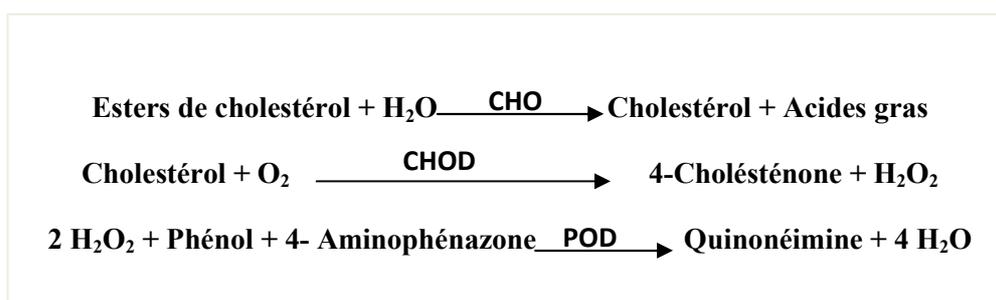
$$\text{Bilirubine plasmatique (mg/l)} = [(A) \text{ échantillon} - (A) \text{ blanc}] \times \text{facteur B}$$

3.2.3 Dosage du cholestérol

➤ Principe

Le cholestérol plasmatique est l'un des principaux lipides sanguins, Le cholestérol estérase hydrolyse les esters du cholestérol. Le cholestérol libéré est oxydé par le cholestérol oxydase en 4-cholesténone 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; Naito et al., 1984).



➤ **Réactif du travail** : dissoudre le contenu de réactif 2 (enzymes) dans un flacon de réactif 1 (tampon). Le réactif de travail est stable 4 mois à 2-8°C.

➤ Mode opératoire

Réactifs	Blanc	Etalon	Echantillon
Réactif de travail (ml)	1.0	1.0	1.0
Etalon (µl)	-	10	-
Echantillon (µl)	-	-	10
H ₂ O distillé (µl)	10	-	-

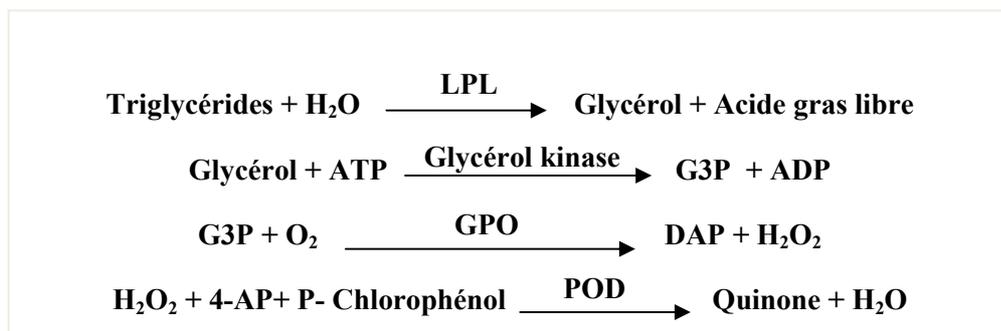
Mélanger et incuber pendant 10 minutes à la température ambiante et lire l'absorbance de l'échantillon et de l'étalon à 505 nm contre le blanc. La coloration est stable pendant 60 minutes.

➤ Calcul de la concentration

$$\text{Cholestérol (g/l)} = \frac{(A)_{\text{Echantillon}}}{(A)_{\text{Etalon}}} \times 200 \text{ mg/dl (concentration de l'étalon)}$$

3.2.4 Dosage des triglycérides

L'hydrolyse des triglycérides dépend de l'action de lipoprotéinlipase (LPL), libérant ainsi le glycérol et des acides gras. 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). Dans la réaction finale, 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).



- **Réactif du travail** : dissoudre le contenu de réactif 2 (enzymes) dans un flacon de réactif 1 (tampon). Le réactif de travail est stable 6 semaines à 2-8°C.
- **Mode opératoire**

Réactifs	Blanc	Etalon	Echantillon n
Réactif de travail (ml)	1.0	1.0	1.0
Etalon (µl)	-	10	-
Echantillon (µl)	-	-	10
H ₂ O distillé (µl)	10	-	-

Mélanger et incuber pendant 5 minutes à la température ambiante et lire l'absorbance de l'échantillon et de l'étalon à 505 nm contre le blanc. La coloration est stable pendant 30 minutes.

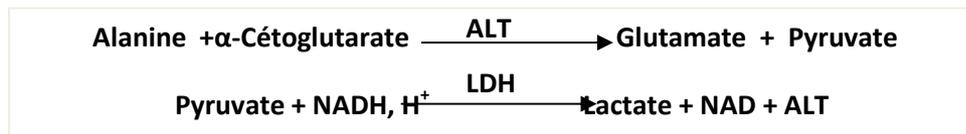
- **Calcul de la concentration**

$$\text{Triglycérides (g/l)} = \frac{(A)_{\text{Echantillon}}}{(A)_{\text{Etalon}}} \times 200 \text{ mg/dl (concentration de l'étalon)}$$

3.2.5 Détermination de l'activité alanine aminotransférase (ALAT/TGP, EC 2.6.1.2)

➤ Principe

L'alanine aminotransférase (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 le lactate déshydrogénase(LDH) et le NADH selon la réaction suivante :



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).

➤ **Réactif de travail** : faire dissoudre un comprimé du réactif R2 dans une fiole du réactif R1. Ce réactif est stable 21 jours à 2-8°C.

➤ Mode opératoire

Réactif de travail (ml)	1.0
Echantillon (μ l)	100

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

➤ Calcul de la concentration

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

3.2.6 Détermination de l'activité aspartate aminotransférase (ASAT/TGO, E2.6.1.1)

➤ Principe

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



- **Réactif de travail** : faire dissoudre un comprimé du réactif R2 dans une fiole du réactif R1. Ce réactif est stable 21 jours à 2-8°C.
- **Mode opératoire**

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

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

- **Calcul de la concentration**

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

3.2.7 Détermination de l'activité lactate déshydrogénase (LDH, EC 1.1.1.27)

- **Principe**

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



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

- **Réactif de travail** : faire dissoudre un comprimé du réactif R2 dans une fiole du réactif R1. Ce réactif est stable 2 jours à 2-8°C.
- **Mode opératoire**

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

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

➤ **Calcul de la concentration**

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

3.2.8 Détermination de l'activité 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) selon la réaction suivante :



➤ **Réactif de travail** : faire dissoudre un comprimé du réactif R2 dans une fiole du réactif R1. Ce réactif est stable 21 jours à 2-8°C.

➤ **Mode opératoire**

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

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

➤ **Calcul de la concentration**

$$\text{Activité phosphatase alcaline (U/L)} = \Delta A / \text{min} \times 3300$$

3.2.9 Dosage de la créatinine plasmatique

➤ **Principe**

Le dosage est basé sur la réaction de la créatinine avec le picrate de sodium, c'est la réaction de JAFFE. La créatinine réagit avec le picrate alcalin pour donner un complexe coloré, mesuré dans un intervalle de temps défini et proportionnel à la concentration en créatinine dans l'échantillon (Murray, 1984).

- **Réactif de travail** : mélanger des volumes égaux du réactif R1 et du réactif R2. Le réactif de travail est stable 10 jours à 15-20°C.

- **Mode opératoire**

Réactifs	Blanc	Etalon	Echantillon
Réactif de travail (ml)	1.0	1.0	1.0
Etalon (μl)	-	100	-
Echantillon (μl)	-	-	100
H ₂ O distillé (μl)	100	-	-

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

- **Calcul de la concentration**

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

3.2.10 Dosage de l'urée

- **Principe**

L'urée est hydrolysée sous l'action de l'uréase en ammoniacque (NH₄) et dioxyde de carbone (CO₂). Les ions d'ammoniacques formés réagissent avec le salicylate et l'hypochlorite de sodium (NaCOI) 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, 1984).



- **Réactif de travail** : faire dissoudre un comprimé du réactif R3 dans un flacon du réactif R1. Ce réactif est stable un mois à 2-8°C.

- **Mode opératoire**

Réactifs	Blanc	Etalon	Echantillon
Réactif de travail (ml)	1.0	1.0	1.0
Etalon (μl)	-	10	-
Echantillon (μl)	-	-	10
H ₂ O distillé (μl)	10	-	-

Mixer et incuber 5 minutes à 37 °C ou 10 minutes à la température ambiante (15-25°C). Lire les absorbances des échantillons et de l'étalon contre le blanc réactif à 340 nm. La coloration finale est stable au moins 30 minutes.

Réactif	Blanc	Etalon	Echantillon
R2 (ml)	1.0	1.0	1.0

➤ **Calcul de la concentration**

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

3.2.11 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 (ions ferreux) sous l'action de l'acide ascorbique. Les ions ferreux donnent un complexe coloré en réagissant avec la ferrozine (Itano, 1984; Perrota et al., 1984).



➤ **Réactifs utilisés**

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

Réactif du travail : faire dissoudre le contenu du tube du réactif R2 dans le flacon du réactif R1. Le mélange est stable trois mois à 2-8°C.

➤ **Mode opératoire**

Réactifs	Réactif de travail Blanc	Etalon	Echantillon Blanc	Echantillon
Réactif de travail (ml)	1.0	1.0	1.0	1.0
R3 (gouttes)	1	1	-	-
H ₂ O distillé (µl)	200	-	-	-
Etalon (µl)	-	200	-	-
Echantillon (µl)	-	-	200	200

On mélange et on incube cinq minutes à 37 °C, puis on mesure l'absorbance à 562 nm.

➤ **Calcul de la concentration**

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

3.3 Exploration de la fonction thyroïdienne et testiculaire

Le dosage de la triiodothyronine (T3), de la thyroxine (T4) et de la Testostérone est effectué à l'aide d'un automate de type « Ellexys 2010 ».

3.4 Dosage des paramètres du stress oxydatif

3.4.1 Préparation de l'homogénat

Un gramme de chaque organe étudié, des rats des différents groupes expérimentaux, est broyé et homogénéisé dans 2ml du tampon TBS (Tris 50mM, NaCl 150mM pH 7.4) à l'aide d'un homogénéisateur (Ultra-Turax), puis centrifugé à 9000tours /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 de stress oxydatif.

3.4.2 Dosage des protéines

➤ **Principe**

Le dosage des protéines est déterminé selon la méthode de Bradford (1976), qui utilise le Bleu Brillant de Coomassie G250 (BBC) comme réactif et l'albumine de sérum de bœuf (BSA) comme standard. Le BBC réagit avec les groupements amines (-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 595nm.

➤ **Mode opératoire**

- ✓ Prélever 0.1 ml de l'homogénat ;
- ✓ Ajouter 5 ml de bleu brillant de Coomassie (BBC) (G250), comme réactif ;
- ✓ Agiter et laisser le mélange à une température ambiante pendant 5 minutes pour la stabilisation de la couleur ;
- ✓ Mesurer l'absorbance de l'échantillon à 595nm contre le blanc contenant l'eau distillée à la place de l'homogénat.

La concentration des protéines est déterminée par comparaison à une gamme étalon d'albumine sérique bovine (BSA) (1 mg/ml) réalisée dans les mêmes conditions que celles présentées dans la Figure 21.

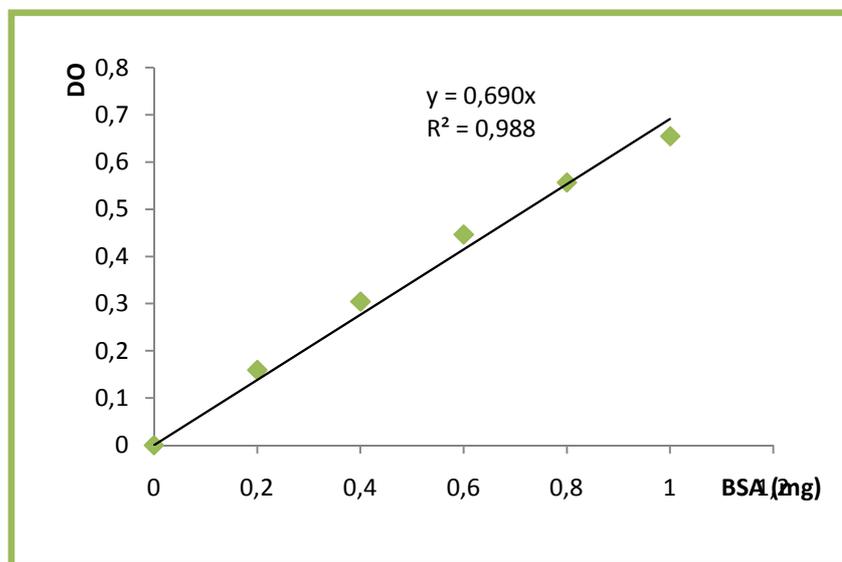


Figure 21 : Gamme d'étalonnage utilisée (BSA 1mg/ml) pour le dosage des protéines.

3.4.3 Détermination du taux de 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 basé sur la condensation de MDA en milieu acide et à chaud (80°C) avec l'acidethiobarbiturique. La réaction entraîne la formation d'un complexe de couleur rose entre deux molécules d'acidethiobarbiturique qui peut être donc mesuré par spectrophotométrie d'absorption à 530 nm.

➤ **Mode opératoire**

- ✓ Prélever 375 µl de l'homogénat (surnageant) ;

- ✓ Ajouter 150 µl de la solution tampon TBS (Tris 50mM, NaCl 150mM 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 120mM) ;
- ✓ 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 suivante:

$$\text{MDA (nmol/mg protéines)} = \frac{DO \times 106}{ExLxXxFd}$$

C : Concentration en nmol/mg de protéines.

DO : Densité optique lue à 530 nm.

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

L : Longueur du trajet optique, $L = 0.779 \text{ cm}$.

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

Fd: Facteur de dilution, $Fd = 0.2083$

3.4.4 Détermination du taux du glutathion réduit (GSH)

➤ principe

Le dosage du glutathion réduit (GSH) est réalisé selon la méthode d'Ellman, (1959) et revisité par Jollow et al. (1974). Le principe de ce dosage repose sur la mesure de l'absorbance optique de l'acide 2-nitro-5-mercapturique qui résulte de la réduction de l'acide 5-5dithio-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'acidesulfosalicylique (0.25%) et laisser pendant 15 minutes dans un bain de glace ;
- ✓ Centrifuger à 1000 tours/min pendant 5 minutes ;
- ✓ Prélever 0.5 ml du surnageant ;

- ✓ Ajouter 1ml du tampon Tris-EDTA (contenant 0.4M de Tris, 0.02M d'EDTA, pH 9.6)
- ✓ Ajouter 0.025 ml de l'acide 5-5-dithio-bis-2-nitrobenzoïque (DTNB) à 0.01 M ;
- ✓ Laisser pendant 5 minutes à une température ambiante et lire les densités optiques à 412nm contre le blanc réactif.

➤ Calcul de la concentration

La concentration du GSH, exprimée en nanomoles par milligramme de protéines (nmol/mg prot), est calculée selon la formule suivante:

$$\text{GSH (nmol /mg protéines)} = \frac{DO \times 1 \times 1.525}{13,1 \times 0.8 \times 0.5 \text{ mg protéine}}$$

DO: Densité optique.

1: Volume total des solutions utilisées dans la déprotéinisation.

1.525: Volume total des solutions utilisées dans le dosage du GSH au niveau du surnageant.

13,1: Coefficient d'extinction molaire du groupement –SH à 412 nm.

0.8: Volume de l'homogénat après déprotéinisation présent dans un 1 ml.

0.5: Volume du surnageant présent dans un 1.525 ml.

3.4.5. Détermination de l'activité enzymatique de la glutathion peroxydase (GPx)

➤ Principe

L'activité enzymatique de la glutathion peroxydase (GPx) est mesurée par la méthode de Flohe et Gunzler (1984). Cette méthode est basée sur la réduction du 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 (0.1mM) ;
- ✓ Ajouter 0.2 ml de la solution tampon TBS (Tris 50mM, NaCl 150mM 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 minutes 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 50mM, NaCl 150mM pH 7.4) ;
- ✓ Ajouter 0.32 ml de DTNB (1.0mM) ;
- ✓ Mélanger et après 5 minutes, lire les densités optiques à 412 nm.

➤ Calcul de l'activité enzymatique

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

$$\text{GPx (nmol GSH/mg protéines)} = \left(\frac{\text{DOEchantillon} - \text{DOEtalon}}{\text{DOEtalon}} \right) \times \frac{5}{\text{mgprotéines}}$$

DOéchantillon : Densité optique de l'échantillon.

DO étalon: Densité optique de l'étalon.

0.04: Concentration de substrat (GSH).

3.4.6. Détermination de l'activité enzymatique de la glutathion-S-transférase

➤ Principe

L'activité enzymatique de la glutathion-S-transférase (GST) est mesurée par la méthode de Habig et al. (1974), celle-ci consiste à fournir à l'enzyme un substrat en général le 1-chloro, 2,4-dinitrobenzène (CDNB), qui réagit facilement avec de nombreuses formes de GST et du glutathion. La réaction de conjugaison de ces deux produits entraîne la formation d'une nouvelle molécule qui absorbe la lumière à 340 nm ; la variation de la densité optique est mesurée pendant 1 à 5 minutes.

➤ Mode opératoire

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

➤ Calcul de l'activité enzymatique

L'activité enzymatique de GST est exprimée en nanomole de GST par minute par milligramme de protéines selon l'équation suivante :

$$\text{GST (CDNB/min/mg protéines)} = \frac{DO_{\text{Echantillon}}/\text{min} - DO_{\text{Blanc}}/\text{min}}{9.6 \times \text{mg protéines}}$$

DO échantillon / min : Densité optique de l'échantillon par minute

DO blanc / min : Densité optique du blanc par minute

9.6 : Coefficient d'extinction molaire du GSH-CDNB exprimé en mM⁻¹.Cm⁻¹

3.4.7. Détermination de l'activité enzymatique de la catalase

➤ Principe

L'activité enzymatique de la catalase est mesurée selon la méthode de Aebi (1984), celle-ci consiste à mesurer la variation de la densité optique à 240nm consécutive à la dismutation du peroxyde d'hydrogène en faisant réagir dans le tampon phosphate (100mM) et H₂O₂ (500mM) pendant 1minutes à pH 7.4 et à une température d'incubation de 25°C.

➤ Mode opératoire

Réactifs	Blanc	Echantillon
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 l'équation suivante:

$$\text{Catalase } (\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{min/mg protéines}) = \frac{\Delta DO/\text{min}}{\varepsilon \cdot X \cdot L \cdot 0,02}$$

ε: Coefficient d'extinction moléculaire de l'eau oxygénée, ε H₂O₂ = 0.043 mM⁻¹.cm⁻¹

L: Trajet optique de la cuve, L= 1 cm.

X: Concentration de protéines en mg/ml.

3.4.8. Détermination de l'activité enzymatique de lasuperoxydedismutase (SOD)

➤ Principe

L'activité enzymatique de lasuperoxydedismutaseest 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 $O_2^{\cdot-}$, ce dernier est 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

Réactifs	Blanc	Etalon	Echantillon
EDTA-Met (0.3 mM) (μl)	1000	1000	1000
Tampon phosphate (50 mM, pH 7.8) (μl)	892.2	892.2	892.2
Échantillon (μl)	-	-	50
Tampon phosphate (50 mM, pH 7.8) (μl)	1000	1000	950
NBT (2.64 mM) (μl)	85.2	85.2	85.2
Riboflavine (0.26 Mm) (μl)	22.6	22.6	22.6

Sous une source de lumière (lampe de bureau), incuber les tubes contenant l'échantillon et le blanc pendant 20 minutes, la lecture de l'absorbance est mesurée à 560 nm.

➤ Calcul de l'activité enzymatique

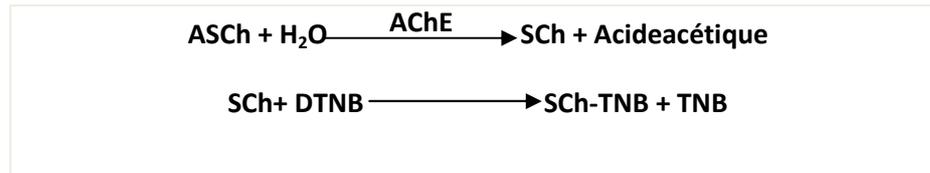
L'activité enzymatique de la SOD est exprimée en unité enzymatique par milligramme de protéines (U/mg de prot) selon l'équation suivante :

$$\text{SOD (U/mg de protéines)} = \left(\frac{\text{DO Blanc} - \text{DO Echantillon}}{\text{DO Blanc}} \times 100 \right) \times 20$$

3.4.9. Détermination de l'activité de l'acétylcholinestérase (AChE)

➤ Principe

L'activité enzymatique de l'acétylcholinestérase est déterminée selon la méthode d'Ellman et al. (1961). Ainsi l'acétylcholinestérase, contenue dans la fraction des tissus, va réagir avec l'acétylthiocholine (ASCh) en libérant l'acétate et la thiocholine (SCh). Cette dernière réagit à son tour avec le 5-5'-Dithio-bis (2-nitrobenzoate) (DTNB) en donnant du TNB produit de couleur jaune qui absorbe à 412 nm et dont la concentration est proportionnelle à la quantité d'enzymes présente dans le milieu.



➤ **Mode opératoire**

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

Après agitation des tubes, la lecture de l'absorbance se fait à 412 nm à un intervalle de temps de 25 minutes (lecture de la DO chaque 3minutes) contre la solution blanc réactif.

➤ **Calcul de l'activité enzymatique**

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

$$\text{AChE (nmol/min/mg protéines)} = \frac{DO/\Delta t \cdot 1000 \cdot V_{\text{cyt}}}{\epsilon \cdot V \cdot P}$$

DO / Δ t : variation de la densité optique par minute ;

V_{cyt} : volume de cytosol

P : concentration de protéines en mg/ml.

ε : coeficient d'extinction molaire de l'AChE égale à 13.6 mmol

V : volume de l'échantillon en ml.

4. Etude histologique

Les coupes histologiques sont réalisées à l'hôpital universitaire d'Ibn Rochd d'Annaba, service d'anatomie-pathologie, à l'aide d'un appareil automatique. Nous avons utilisé la technique classique décrite par Hould (1984), qui comporte les étapes suivantes:

a) **La fixation** : la fixation permet la conservation des structures et le durcissement des pièces, elle est basée sur l'immersion des échantillons dans le formol. Ensuite, les organes

à étudier de chaque rat sont retirés du formol puis coupés à l'aide d'une lame bistouri afin de réaliser des prélèvements pour l'étude histologique avec une surface de 1 à 2 cm² et une épaisseur proche de 1.5 mm ; les pièces obtenues sont ensuite mises dans des cassettes spécialisées à parois tournées qui permettent le passage des liquides.

- b) **Déshydratation** : comme la paraffine n'est pas miscible à l'eau, les échantillons doivent être alors complètement déshydratés avant l'inclusion dans la paraffine. La déshydratation se fait grâce à un automate qui fait immerger les échantillons dans des bains d'éthanol à concentration croissante (70, 95 et 100 %), puis dans des bains de xylène qui constitue un agent éclaircissant donnant au tissu une certaine transparence. Ensuite, dans l'étuve le xylène s'évapore des pièces anatomiques.
- c) **Inclusion et réalisation des blocs** : Cette étape a pour but de permettre la réalisation de coupes fines et régulières. les échantillons déshydratés sont imprégnés de paraffine liquide par passage dans plusieurs bains ; puis à l'aide d'une pince métallique, chaque pièce est extraite du dernier bain d'imprégnation et rapidement versée entre des barres adaptables à leurs dimensions dites barres de Leuckart, dont le fond contient de la paraffine. Après refroidissement, on se trouve donc en présence de blocs de paraffine durs, à l'intérieur desquels se trouvent les échantillons inclus et orientés selon le plan de coupe choisi. Cette opération fait appel à des appareils dits à inclusion renfermant 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. A la fin, on accompagne le bloc d'une étiquette d'identification.
- d) **Confection des coupes** : elles sont faites à l'aide d'un appareil spécial appelé microtome, qui permet de réaliser des tranches de section de 2 à 5 µm d'épaisseur reliées entre elles sous forme de rubans, lesquelles sont par la suite étalées, dépliées et fixées sur des lames porte-objets à l'aide d'une eau gélatineuse chauffée.
- e) **Déparaffinage et réhydratation** : Le déparaffinage est fait d'abord à chaud, les lames sont donc placées dans l'étuve à 100°C pendant 20 minutes ; ensuite, elles sont placées dans deux bains d'xylène (solvant de la paraffine). Concernant la réhydratation, les lames sont immergées dans des bains d'éthanol à degré décroissant (100, 90, 80 et 70%), puis dans l'eau distillée.
- f) **Coloration et montage** : la coloration est faite selon la technique à l'Hématoxyline-Eosine ou (Hématéine-Eosine), qui nécessite la présence de l'alcool acide(100ml d'alcool éthylique à 70% + 50ml d'acideHCl), l'eau ammoniacale (100ml d'eau distillée + 2ml

d'ammoniaque) et la solution d'Eosine (100ml Eosine solution aqueuse à 3%, 125ml alcool éthylique à 95%, 375ml eau distillée et 2 gouttes d'acide acétique). La coloration et le montage suivent les étapes suivantes :

- Immerger les lames dans un bain d'hématoxyline de Harris (15minutes) qui colore en bleu violacée les structures basophiles (noyaux).
- Différencier les coupes dans l'alcool acide, puis les rincer à l'eau de robinet ; ensuite, vérifier la différenciation au microscope.
- Bleuir dans un bain d'eau ammoniacale.
- Immerger dans un bain d'Eosine (15secondes à 2minutes) qui colore les structures acidophiles (cytoplasme) en rose.
- Enfin, déshydrater, éclaircir et monter les échantillons entre lame et lamelle ; puis, passer à l'observation au microscope photonique, lequel est équipé d'un appareil photographique.

5. Traitement statistique des résultats

Les résultats sont reportés dans des tableaux, exprimés sous forme de moyenne plus ou moins l'écart type (Moy±SEM) illustrés par des histogrammes ; les moyennes sont comparées par le test t de Student.

Nous avons effectué deux comparaisons:

- a)** Les groupes traités (MD, Se+Zn, MD+Se+Zn, AC, MD+AC) par rapport au groupe témoin :

* : Différence significative ($p \leq 0.05$) ;

** : Différence hautement significative ($p \leq 0.01$) ;

*** : Différence très hautement significative ($p \leq 0.001$).

- b)** Les groupes traités (MD+Se+Zn, MD+AC) par rapport au groupe traité (MD):

: Différence significative ($p \leq 0.05$) ;

: Différence hautement significative ($p \leq 0.01$) ;

: Différence très hautement significative ($p \leq 0.001$).

I. RESULTATS DE LA PREMIERE EXPERIMENTATION

1. Etude pondérale

1.1 Variation du poids corporel

Après 28 jours de traitement, nos résultats montrent une diminution significative ($p \leq 0.05$) du poids corporel chez les rats du lot MD (-19.4%) comparativement aux rats du lot témoin. Parallèlement, le traitement des rats par la combinaison Zn+ Se a corrigé le poids corporel par une augmentation considérable par rapport aux rats du lot MD, de l'ordre de (+6.37).

1.2 Variation de la consommation quotidienne d'aliment

Dans notre étude, les résultats montrent une diminution significative ($P \leq 0.05$) de la consommation quotidienne d'aliment chez le groupe MD (-2.08 %) par rapport au groupe témoin. Par contre, on ne note aucune différence significative entre les rats du groupe (MD + Se + Zn) comparativement au groupe MD.

1.3 Variation de la consommation quotidienne d'eau de boisson

Concernant la consommation quotidienne de l'eau de boisson, nos résultats révèlent une diminution significative ($p \leq 0.05$) de l'ordre de (-29.51 %) chez le groupe traité par MD comparativement au groupe témoin. En revanche, on note une augmentation hautement significative ($p \leq 0.01$) chez le groupe recevant le sélénium plus zinc avec le MD comparativement au groupe MD, de l'ordre de (+36.38 %).

1.4 Variation du poids relatif de certains organes

Nous avons étudié la variation des poids relatifs (PR) des organes suivants ; le foie, les reins et les testicules chez les rats témoins et les rats recevant le Sélénium et Zinc, Méthidathion ou Méthidathion/Sélénium + Zinc.

Dans notre étude, les résultats montrent une augmentation hautement significative ($p \leq 0.01$) du poids relatif du foie et des testicules chez le lot MD comparativement au lot témoin. Nos résultats montrent également une augmentation significative ($p \leq 0.05$) du poids relatif des reins chez le lot MD par rapport au lot témoin. Par contre, après supplémentation de la combinaison (sélénium+zinc), on enregistre une diminution significative ($p \leq 0.01$) du poids relatif du cerveau par rapport au groupe traité par MD. Elle est considérable pour le poids relatif des autres organes étudiés.

Les résultats obtenus, dans le cadre de l'étude de la variation du poids corporel, de la consommation quotidienne d'aliment et de l'eau de boisson, ainsi que la variation du poids relatif des organes étudiés sont présentés dans les Figures (22, 23 et 24).

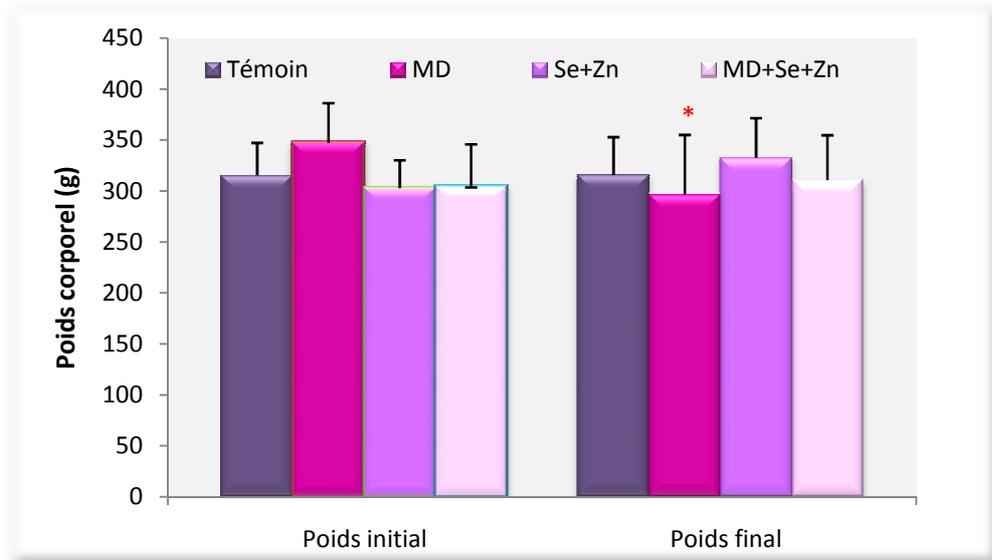


Figure 22. Variation de poids corporel PC (g) chez les rats témoins et les rats traités; par le Méthidathion, sélénium et zinc et à la combinaison (Méthidathion/ Sélénium+zinc).

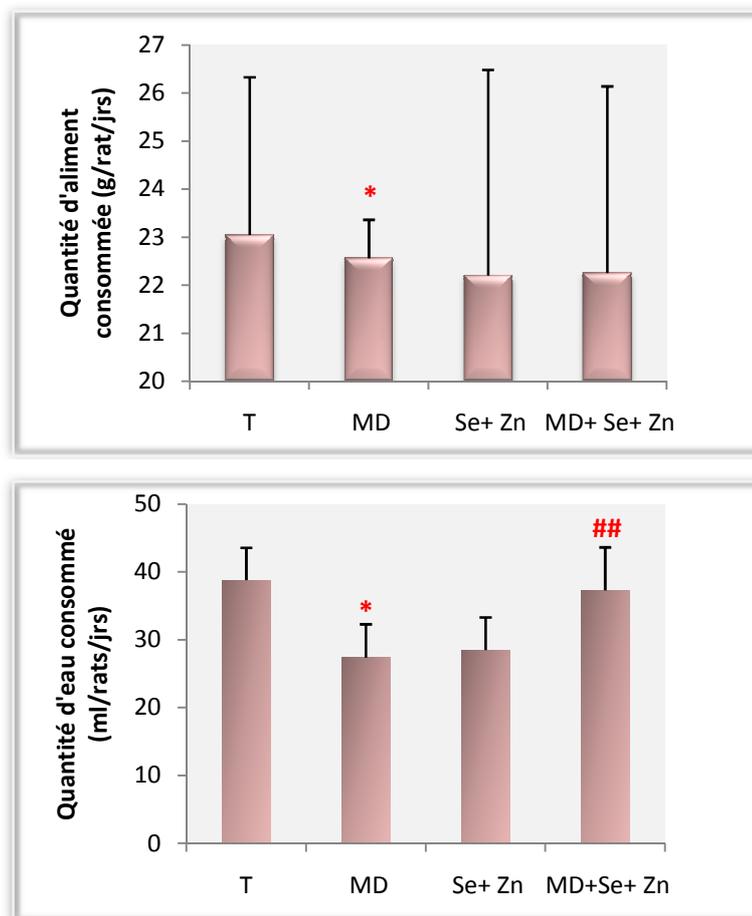


Figure 23. Variation de la consommation d'aliment et de l'eau de boisson chez les rats témoins et les rats traités; par le Méthidathion, sélénium et zinc et à la combinaison (Méthidathion/ Sélénium+zinc)

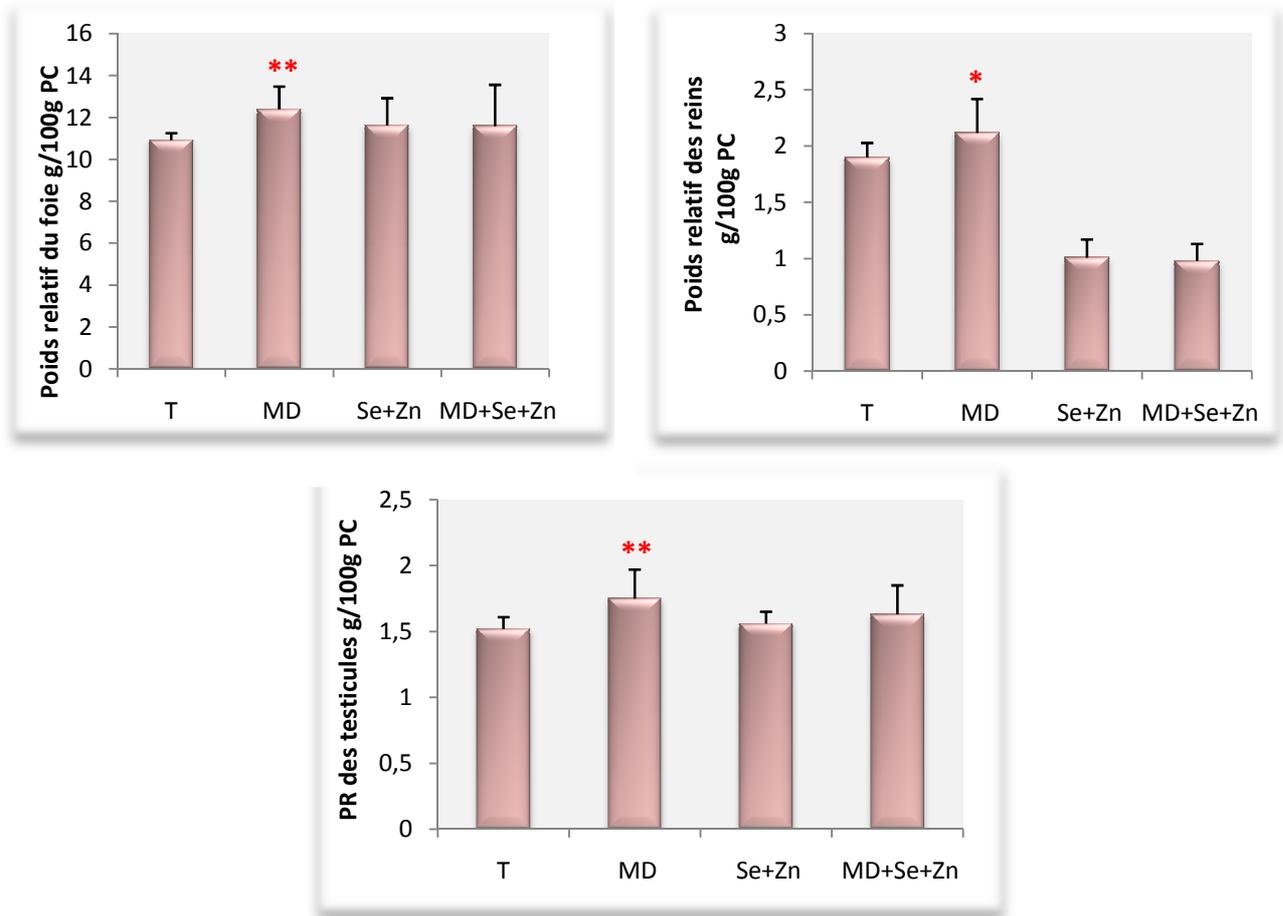


Figure 24. Variation du poids relatif PR (g/100g de poids corporel) des organes (foie, reins et testicules) chez les rats témoins et les rats traités; par le Méthidathion, sélénium et zinc et à la combinaison (Méthidathion/ Sélénium+zinc).

2. Variation des paramètres hématologiques

2.1 Nombre de globules rouges

D'après les résultats obtenus, nous avons enregistré une diminution hautement significative du nombre de globules rouges ($p \leq 0.01$) de l'ordre de (-39.17%) chez les rats du groupe MD par rapport au groupe témoin. En revanche, nous avons enregistré une augmentation considérable chez le lot (MD+Se+Zn) par rapport au lot MD de l'ordre de (+27.56%).

2.2 Taux d'hémoglobine (Hb) et taux des plaquettes (Pt)

Les résultats obtenus montrent une diminution significative ($p \leq 0.05$) du taux d'hémoglobine de l'ordre de (-8.42%) et du taux de plaquettes de l'ordre de (-15.08%) chez les rats du lot MD par rapport au lot témoin. Par contre, la supplémentation de la combinaison (Se + Zn) a amélioré le taux des plaquettes par une augmentation significative ($p \leq 0.05$) par rapport au lot traité MD.

2.3 Volume globulaire moyen (VGM) et concentration corpusculaire moyen en hémoglobine (CCMH)

Nos résultats ne révèlent aucune différence significative du taux de CCMH et du VGM entre les rats du lot traité (MD, MD+Se+Zn, Se+Zn) par rapport au lot témoin.

2.4 Taux d'hématocrite et nombre de globule blancs

Nos résultats montrent une augmentation hautement significative du taux d'hématocrite et du nombre de globule blanc chez les rats du lot traité (MD) par rapport au lot témoin.

3. Effet sur la concentration sérique du fer

Nos résultats indiquent une augmentation hautement significative ($p \leq 0.01$) de la concentration du fer sérique chez le lot MD par rapport au lot témoin de l'ordre de (+20.25%). Alors qu'on note une diminution non significative pour le lot traité par (MD+Se+Zn) par rapport au lot traité par MD.

Les résultats obtenus, relatifs à la variation des paramètres hématologiques et la concentration en Fer sont présentés dans le Tableau 5.

Tableau 5: Variation des paramètres hématologiques et de la concentration en fer sérique chez les rats témoins et les rats traités; par le Méthidathion, sélénium et zinc et à la combinaison (Méthidathion/ Sélénium+zinc).

Paramètres	Lots expérimentaux			
	T	MD	Se + Zn	MD + Se + Zn
Globule rouge (x10⁶/µl)	6.74±0.60	4.10±0.60**	4.77±1.32	5.23±0.14
%	-	-39.17	-	+27.56
Globule blanc (x10³/%)	4.61±1.01	4.83±1.83	6.02±0.17	7.48±0.51 [#]
%	-	+4.54	-	+54.86
Taux d'hématocrite (%)	25.21±5.02	28.6±7.50	23.74±0.71	26.15±0.76
%	-	+13.44	-	-8.56
Taux d'hémoglobine (g/dl)	9.50±1.30	8.70±2.14*	8.4±0.23	8.98±0.27
%	-	-8.42	-	+3.22
CCMH (g/dl)	34.53±0.50	34.03±0.30	35.85±0.27	34.36±0.43
%	-	-	-	-
VGM (µ³)	50.04±1.10	50.50±0.80	49.4±2.32	49.76±2.42
%	-	-	-	-
Plaquette (x10³/%)	355.10±32.23	298.32±19.45*	365.1±7.32	397.75±20.5 [#]
%	-	-15.98	-	+12.01
Fer sérique (µg/dl)	203,86±45,12	245,15±23,24**	255,12 ±36,96	234,13±33,48
%	-	+20.25	-	+4.06

*p≤ 0.05 ; **p≤ 0.01 ; ***p≤0.001 par comparaison avec les rats témoins.

[#]p≤0.05 ; ^{##}p≤0.01 par comparaison avec les rats traités par MD.

P : Seuil de signification

4. Variation des paramètres biochimiques

4.1 Concentration plasmatique en glucose

D'après les résultats obtenus, on observe une augmentation significative ($p \leq 0.05$) de la concentration plasmatique en glucose de l'ordre de (+4.67%) chez le groupe traité par le Méthidathon comparativement au groupe témoin. Par contre, on enregistre un rétablissement par une diminution significative de la concentration plasmatique en glucose chez les lots traités par (MD+Se+Zn) comparativement au lot traité par MD.

4.2 Concentration plasmatique en bilirubine directe

Les résultats obtenus montrent que l'administration de Méthidathon a induit une diminution significative de la concentration plasmatique de bilirubine directe ($p \leq 0.05$) de l'ordre de (-41.30%) chez les rats du lot MD par rapport au lot témoin. Par contre, on note que l'administration de la combinaison Se+Zn a amélioré la concentration en bilirubine par une diminution significative ($P \leq 0.05$) chez les lots traités par (MD+Se+Zn) par rapport au lot traité par MD.

4.3 Concentration plasmatique en cholestérol et triglycérides

Nos résultats révèlent une diminution significative du taux de cholestérol ($p \leq 0.01$), tandis qu'une augmentation significative des triglycérides ($p \leq 0.05$) est enregistrée chez les rats du lot MD par rapport au lot témoin. Par contre, le traitement des rats par la combinaison (MD+Se+Zn) a entraîné une amélioration du taux de cholestérol et des triglycérides par rapport aux rats traités par le Méthidathion.

4.4 Effet sur l'activité des aminotransaminases

Comparativement au groupe témoin, le traitement des rats par MD induit une augmentation significative de l'activité enzymatique des transaminases, l'alanine aminotransférase (ALAT) et l'aspartate aminotransférase (ASAT) de l'ordre de (+40%) et (80.56 %) respectivement. En revanche, on enregistre un rétablissement par une diminution significative de l'activité de l'ALAT et de l'ASAT chez les groupes traités par les combinaisons MD+Se+Zn par rapport au groupe traité par MD.

4.5 Effet sur l'activité de la phosphatase alcaline (PAL)

Concernant l'activité enzymatique de la phosphatase alcaline, nos résultats révèlent une augmentation significative ($p \leq 0.001$) chez le lot des rats traités par MD par rapport au lot témoin. Par ailleurs, on enregistre une amélioration par une diminution significative chez le lot traité par (MD+Se+Zn) comparativement au lot MD.

4.6 Effet sur l'activité de lactate déshydrogénase (LDH)

Nos résultats illustrent une augmentation significative ($p \leq 0.01$) de l'activité enzymatique de lactate déshydrogénase chez le lot des rats traités par MD comparativement au lot témoin. Cependant, le traitement des rats par Se+Zn induit une baisse significative de l'activité PAL comparativement au lot MD de l'ordre de -47.62 %.

4.7 Concentration plasmatique en urée et en créatinine

Comparativement au lot témoin, l'administration de Méthidathion provoque une augmentation significative du taux plasmatique de l'urée ($p \leq 0.01$) et de la créatinine ($p \leq 0.05$). Par contre, chez les rats traités par MD+Se+Zn, ce taux est corrigé par une diminution significative ($p \leq 0.01$) comparativement au groupe traité par MD.

Les résultats de la variation des paramètres biochimiques de la fonction hépatique et rénale chez les rats témoins et traités sont présentés dans les Figures (25, 26 et 27).

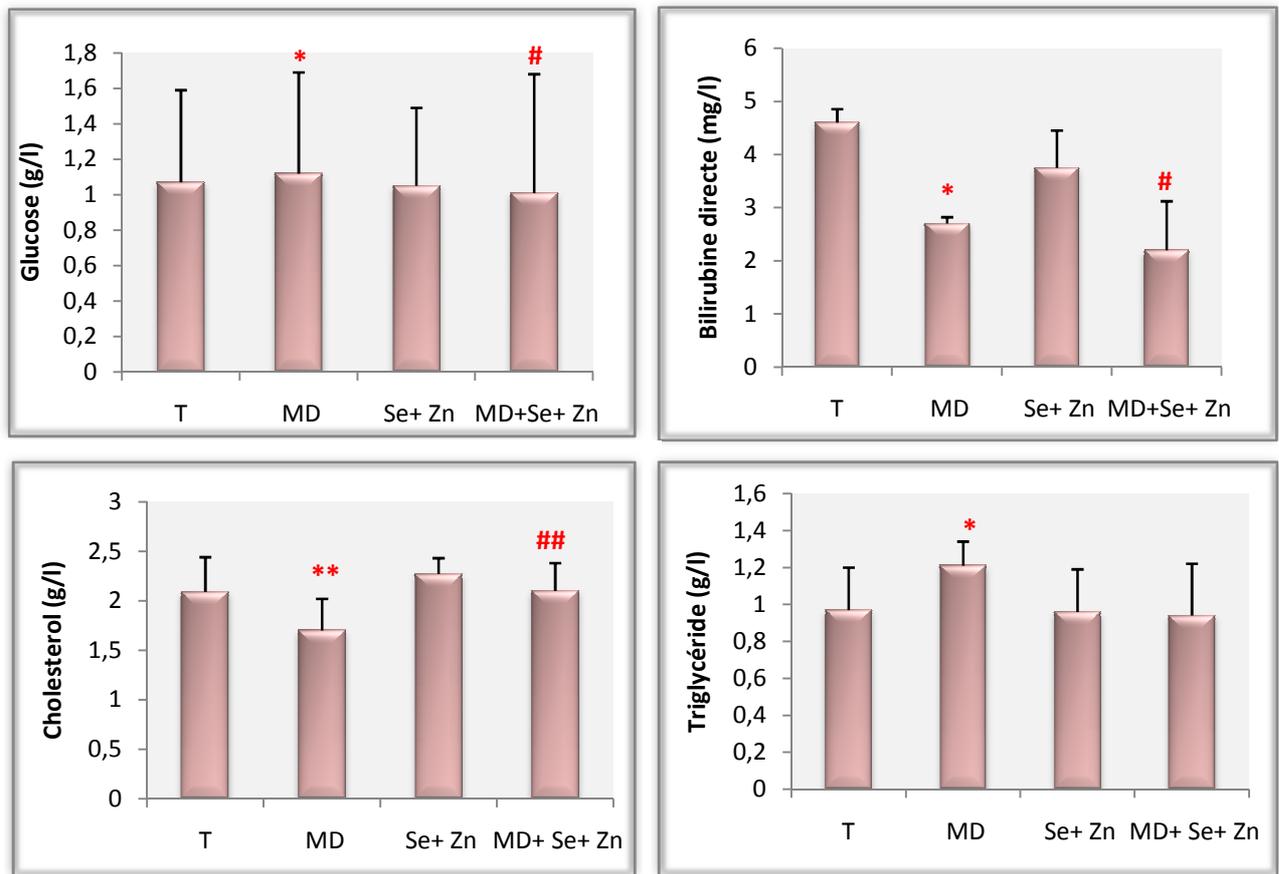


Figure 25. Variation de la concentration plasmatique en (mg/dl) de glucose, de la bilirubine directe, de cholestérol et des triglycérides chez les rats témoins et les rats traités; par le Méthidathion, sélénium et zinc et à la combinaison (Méthidathion/ Sélénium+zinc)

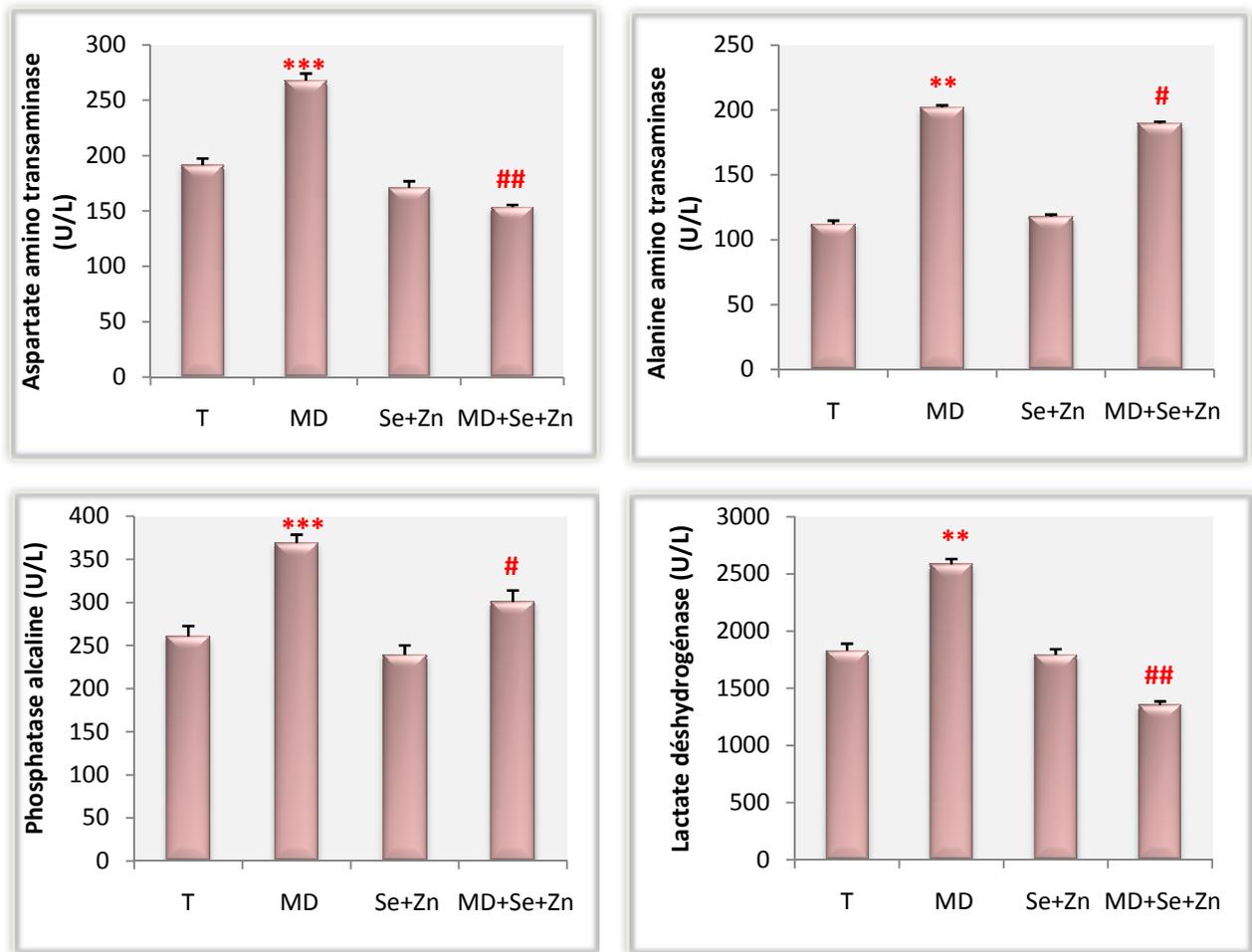


Figure 26. Variation de l'activité enzymatique des transaminases, de la phosphatase alcaline et du lactate déshydrogénase (U/L) chez les rats témoins et les rats traités ; par le Méthidathion, sélénium et zinc et à la combinaison (Méthidathion/ Sélénium+zinc)

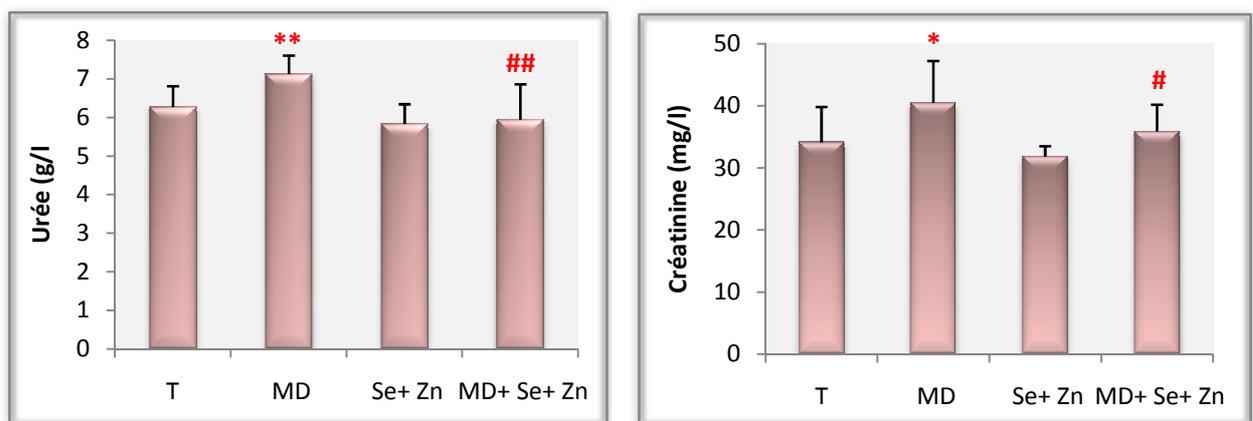


Figure 27. Variation de la concentration plasmatique en (mg/dl) de l'urée et de la créatinine chez les rats témoins et les rats traités; par le Méthidathion, sélénium et zinc et à la combinaison (Méthidathion/ Sélénium+zinc)

5. Etude de quelques paramètres du stress oxydatif

Les paramètres du stress oxydant (MDA, GSH), dans les organes (foie, reins et testicules) des rats traités et les rats témoins après 28 jours de traitement, sont présentés dans la Figure 28 et 29.

5.1 Malondialdéhyde (MDA)

D'après nos résultats, on constate que le traitement des rats, par le Méthidathion, provoque une augmentation significative ($p \leq 0.05$) du taux de malondyaldéhyde dans les organes à savoir : foie (+22.66 %), reins (+32.03 %) et testicules (+86 %). En revanche, la co-administration de Sélénium/Zinc avec le Méthidathion a significativement réduit le taux de MDA dans les organes étudiés (Foie, reins et testicules) comparativement au groupe des rats traités uniquement par le Méthidathion.

5.2 Glutathion réduit (GSH)

Le traitement des rats par le Méthidathion, à raison de 5 mg/Kg PC pendant 28 jours, entraîne une diminution de la teneur cellulaire en glutathion dans les organes. Il est caractérisé par une diminution très hautement significative dans le foie (-33.07%), hautement significative dans les reins (-37.43%), et significative dans les testicules de l'ordre de (-13.34 %). Tandis que la co-administration de la combinaison (MD+Se+Zn) a significativement augmenté le taux de GSH dans les organes étudiés (Foie, reins et testicules) en comparaison avec le groupe des rats traités uniquement par le Méthidathion.

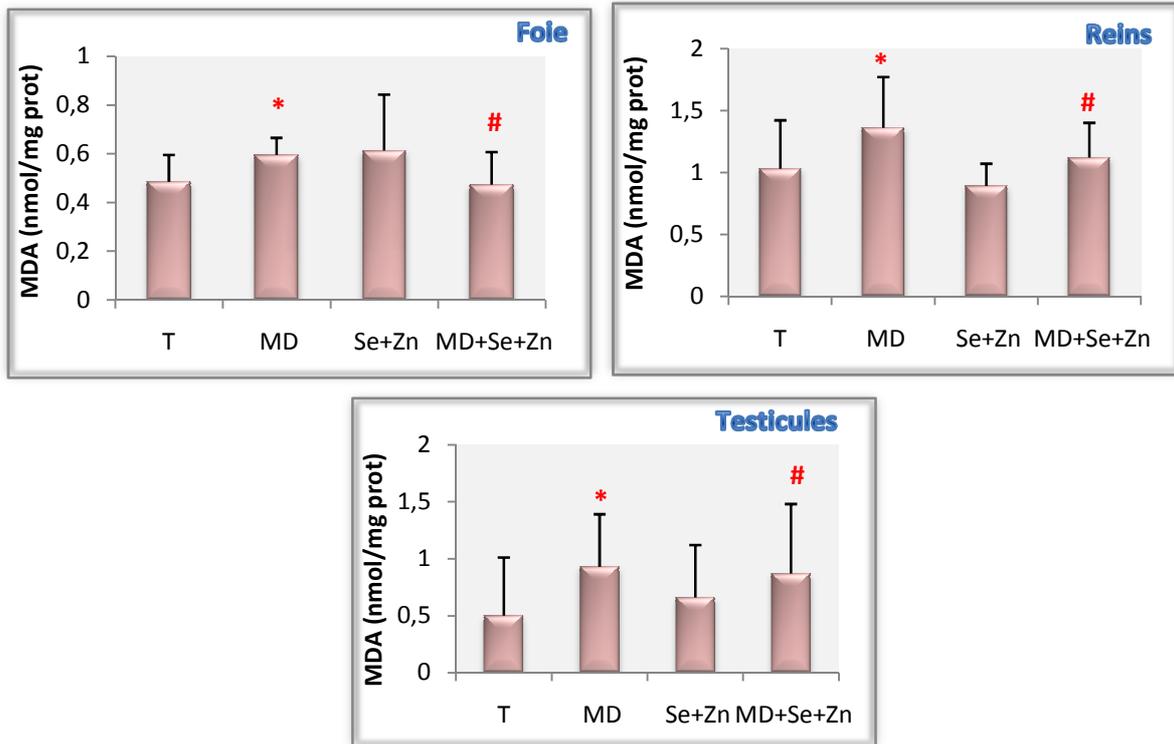


Figure 28. Variation de MDA (nmol/mg prot) dans les organes (foie, reins, et testicules) chez les rats témoins et les rats traités ; par le Méthidathion, sélénium et zinc et à la combinaison (Méthidathion/ Sélénium+zinc)

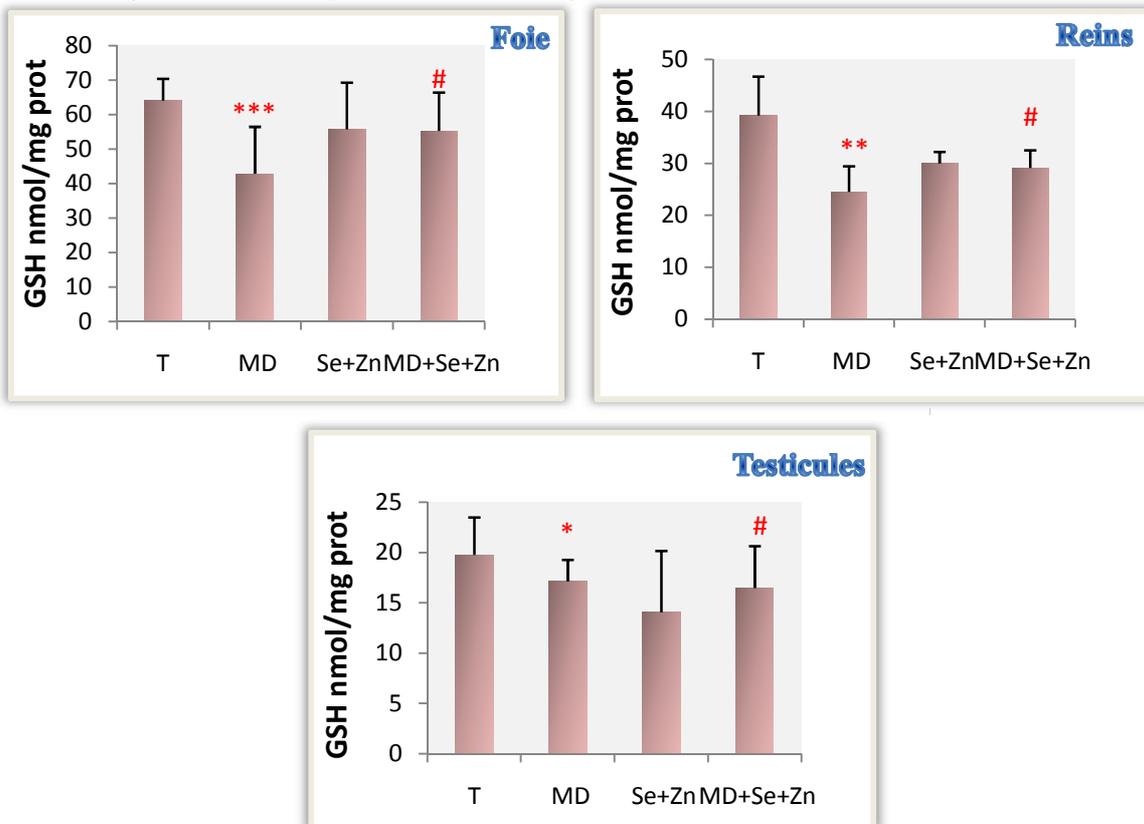


Figure 29. Variation de la teneur cellulaire en Glutathion (nmol/mg prot) dans les organes (foie, reins et testicules) chez les rats témoins et les rats traités ; par le Méthidathion, sélénium et zinc et à la combinaison (Méthidathion/ Sélénium+zinc).

5.3 Les enzymes antioxydantes

Les résultats des activités de certaines enzymes antioxydantes (GPx, GST, SOD et CAT) sont présentés dans les Tableau 7.

5.2.1 Glutathion peroxydase (GPx)

D'après les résultats obtenus, on observe une diminution significative ($p \leq 0.05$) de l'activité enzymatique de la glutathion peroxydase (GPx) dans les organes ci-après ; foie (-21.31%), reins (-29.82%), alors qu'on enregistre une augmentation hautement significative ($p \leq 0.01$) dans les testicules (+46.80%). En revanche, on enregistre une amélioration significative de l'activité de la GPx dans les organes étudiés chez les rats traités par Se+ Zn et MD+Se+ Zn) en comparaison avec le groupe des rats traités uniquement par le Méthidathion.

5.2.2 Glutathion - S- transférase (GST)

L'administration du Méthidathion, à une dose de 5 mg/Kg PC pendant 28 jours, entraîne une diminution significative ($p \leq 0.05$) de l'activité enzymatique de la Glutathion-S-Transférase (GST) dans le foie (-18.84 %) et les reins (-21.03%), et une diminution hautement significative ($p \leq 0.01$) dans les testicules (-31.76%). Par ailleurs, on enregistre une amélioration par une augmentation significative de l'activité de la GST dans les organes étudiés dans le cas du groupe de rats traités par Se+Zn+ MD en comparaison avec celui traité uniquement par MD.

5.2.3 Superoxydedismutase (SOD)

D'après nos résultats, on enregistre une diminution significative ($p \leq 0.05$) de l'activité enzymatique de la superoxydedismutase (SOD) dans le foie (-25.73%), tandis qu'on note une augmentation hautement significative ($p \leq 0.01$) dans les reins (+83.19%) et aucune différence significative dans les testicules. Par contre, la perturbation de l'activité enzymatique de la SOD tissulaire est corrigée après le traitement des rats par le Sélénium/Zinc.

5.2.4 Catalase (CAT)

L'administration du Méthidathion, à raison de 5 mg/Kg PC, provoque une diminution significative ($p \leq 0.05$) de l'activité enzymatique de la catalase dans les organes : foie (-15.73%), reins (-63.24%) et testicules (-44.64%) comparativement au groupe témoin. Cependant, on enregistre, chez le groupe de rats traités par Se+Zn avec le Méthidathion, un rétablissement de cette activité dans les organes étudiés par rapport au groupe de rats traités uniquement par le MD.

Tableau 6.Activité enzymatique de la GPx ($\mu\text{mol GSH}/\text{min}/\text{mg}$), de la GST ($\text{nmol GST}/\text{min}/\text{mg prot}$), de la SOD ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg prot}$) et de la CAT ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{min}/\text{mg prot}$) dans les organes (Foie, reins et testicules) chez les rats témoins et les rats traités par le Méthidathion et à la combinaison (Méthidathion/Sélénium+zinc).

Paramètres		Lots expérimentaux			
		T	MD	Se + Zn	MD + Se + Zn
GPx ($\mu\text{mol GSH}/\text{min}/\text{mg prot}$)	Foie	16.94±3.31	13.33±1.63*	16.54±5.13	18.17±3.26#
	%	-	-21.31	-	+7.26
	Reins	9.89±0.21	6.94±0.16*	12.76±3.28	12.76±3.07##
	%	-	-29.82	-	+29.01
	Testicules	11.11±2.4	16.31±4.5**	11.50±3.69	16.09±1.33
	%	-	+46.80	-	+44.82
GST (CDNB/ $\text{min}/\text{mg prot}$)	Foie	20.43±8.46	16.58±5.61*	25.72±8.30	28.37±10.48#
	%	-	-18.84	-	+38.86
	Reins	12.17±6.94	9.61±4.58*	9.84±3.86	13.54±12.48
	%	-	-21.03	-	+11.25
	Testicules	43.35±6.32	29.58±11.74**	30.84±12.18	40.56±9.55#
	%	-	-31.76	-	-4.22
SOD (U/ mg protéine)	Foie	25.02±6.23	18.58±1.32*	16.00±2.79	23.17±4.24#
	%	-	-25.73	-	-7.39
	Reins	28.63±10.93	52.45±12.06**	28.27±7.00	44.35±7.07
	%	-	+83.19	-	+54.90
	Testicules	58.55±19.07	48.88±12.85	44.05±17.33	50.12±29.72
	%	-	-16.51	-	-14.39
CAT ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{min}/\text{mg prot}$)	Foie	36.47±7.30	30.73±4.17*	38.97±2.68	40.59±10.78#
	%	-	-15.73	-	+11.29
	Reins	2.53±0.01	0.93±0.01*	1.46±0.66	2.56±0.28##
	%	-	-63.24	-	+1.18
	Testicules	2.24±1.04	1.24±0.56*	1.62±0.44	2.32±0.66##
	%	-	-44.64	-	+3.57

*p≤ 0.05 ; **p≤ 0.01 ; ***p≤0.001 par comparaison avec les rats témoins.

#p≤0.05 ; ##p≤0.01 par comparaison avec les rats traités par MD.

P : Seuil de signification

6. Effet sur la concentration sérique des hormones thyroïdiennes

6.1 Triiodothyronine

Nos résultats révèlent que le traitement des rats par MD à raison de 5 mg/kg P.C provoque une diminution significative du taux sérique du T3 (-23.52 %) comparativement au lot témoin. Alors qu'on enregistre un rétablissement par une augmentation significative du taux sérique du T3 est enregistrée après le traitement des rats par la combinaison (MD+Se+Zn).

6.2 Thyroxine

Le dosage radio-immunologique de la T4 sérique ne montre aucune différence significative chez les différents rats traités (MD, MD+Se+Zn, Se+Zn) par rapport au groupe témoin.

7. Effet sur la concentration sérique en testostérone

Les résultats obtenus montrent une diminution du taux de la testostérone sérique chez les rats traités par le Méthidathion par rapport au groupe des rats témoins. En revanche, l'administration de la combinaison Se + Zn+ MD entraîne une amélioration par une augmentation significative ($p \leq 0.01$) de la concentration sérique en testostérone par rapport au lot traité par MD.

Les résultats obtenus, relatifs à la variation de la concentration sérique en T3, T4 et Testostérone des rats traités et témoins sont présentés dans le Tableau 8.

Tableau 7. Variation de la concentration sérique (ng/ml) en triiodothyronine (T3), en thyroxine (T4) et en testostérone chez les rats témoins et les rats traités ; par le Méthidathion et à la combinaison (Méthidathion/ Sélénium+zinc)

Paramètres	Lots expérimentaux			
	T	MD	Se+Zn	MD+Se+Zn
T3 (ng/ml)	5.10±0.72	3.9±0.44**	5.73±1.61	5.13±1.78 [#]
%	-	-23.52	-	+0.58
T4 (ng/ml)	10.52±3.89	9.61±1.66	11.25±4.35	10.02±2.44
%	-	-8.65	-	-4.75
Testostérone (ng/ml)	1.75±0.8	0.81±0.59*	1.71±0.97	2.44±1.09 ^{##}
%	-	-53.71	-	+39.42

* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$ par comparaison avec les rats témoins.

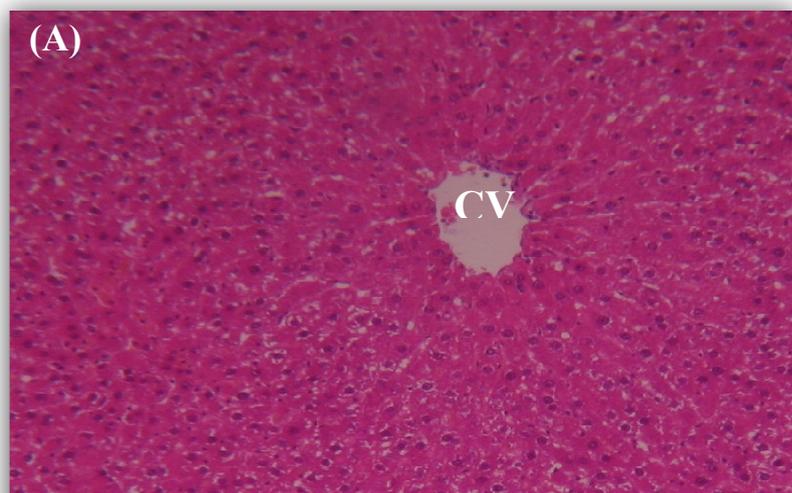
[#] $p \leq 0.05$; ^{##} $p \leq 0.01$ par comparaison avec les rats traités par MD.

P : Seuil de signification

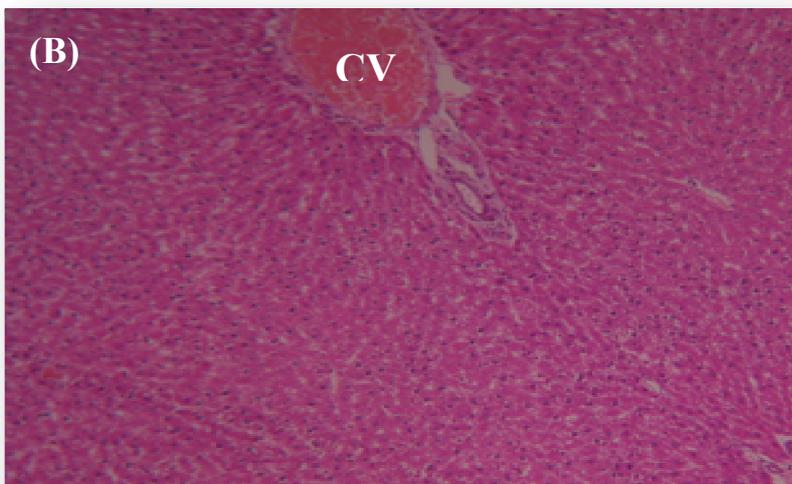
8. Impact sur l'histoarchitecture du foie

L'observation microscopique (x100) du foie des ratstémoins indique que le foie à une structure essentiellement cellulaire, basée sur la disposition des hépatocytes en travées le long des capillaires sinusoides, ou travées de Remak (Figure 30 : A et B).

Par contre, l'observation microscopique du foie des rats traités par le Méthidathion (5mg/Kg PC) pendant 28 jours, révèle un changement cellulaire bien visible au niveau des hépatocytes (Figure 31 C et D), caractérisé par une congestion vasculaire, une infiltration mononucléaire, une dilatation des sinusoides, une hémorragie et une nécrose tissulaire. Ces altérations graves peuvent contribuer à un dysfonctionnement de cet organe. Par ailleurs, l'étude histologique du foie des rats traités par la combinaison Méthidathion plus sélénium et zinc présente une amélioration partielle au niveau de la structure des hépatocytes comparativement au groupe de rats traités par le Méthidathion. Voir Figure 30 E.

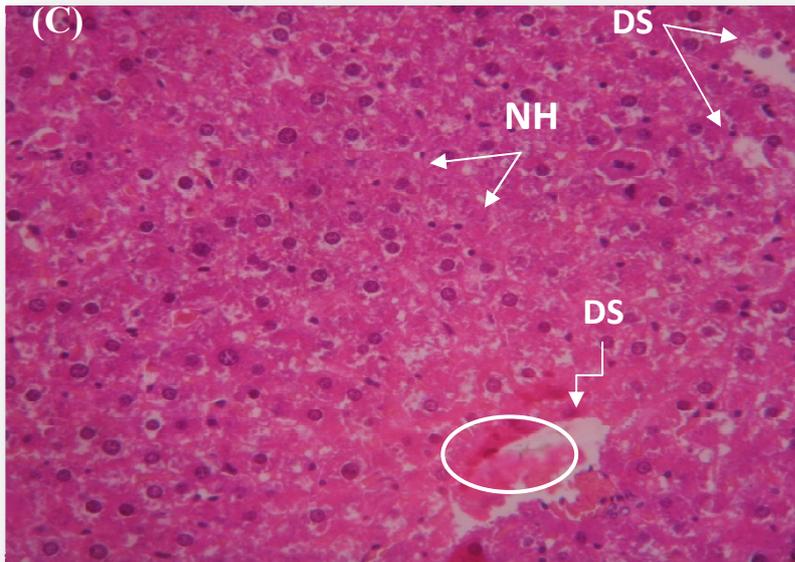


A : Coupe histologique du foie (HE x100) d'un rat témoin



B : Coupe histologique du foie (HE 100x) d'un rat traité pendant 28 jours par la combinaison sélénium plus zinc (Se + Zn)

Figure 30. Coupes histologiques du foie de rat témoin et traités par le sélénium et le zinc colorés à Hématéine-Eosine 100X. CV : Veine centrale

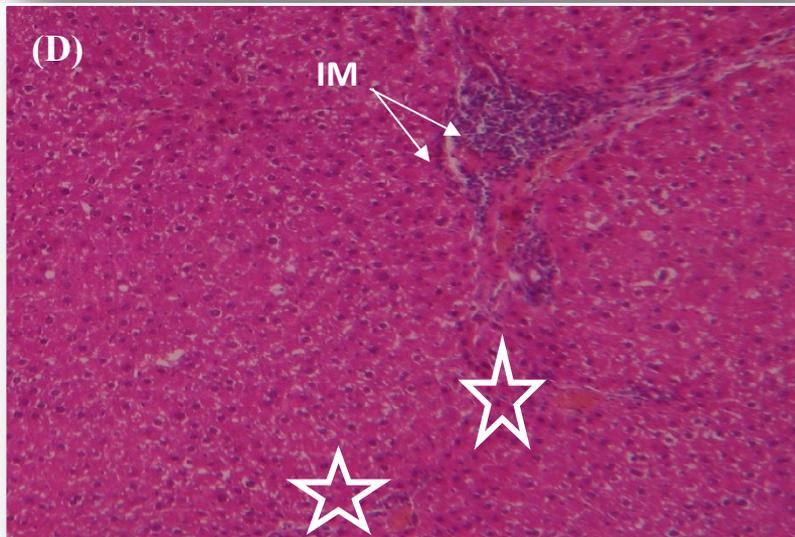


C : Coupe histologique du foie (HE 100x) d'un rat traité par le Méthidathion (5mg/kg PC) pendant 28 jours

DS : Dilatation des sinusoides

NH : Nécrose hépatocytaire

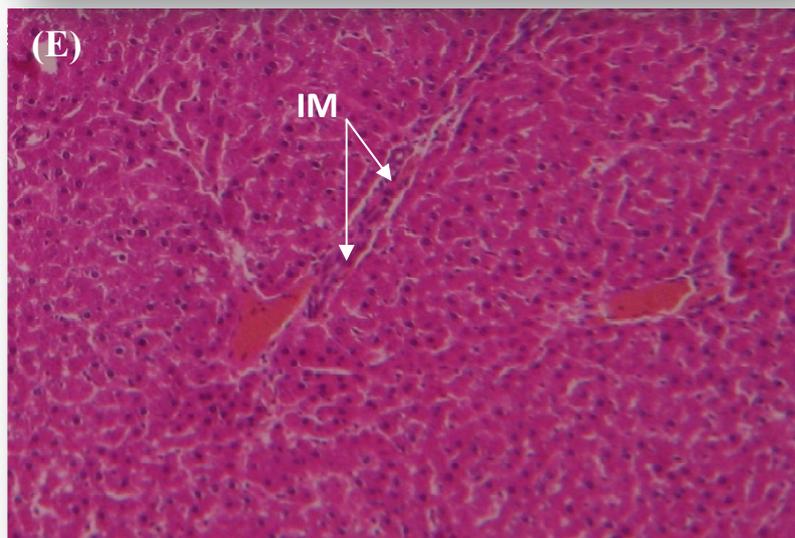
○ Congestion vasculaire



D : Coupe histologique du foie (HE 100x) d'un rat traité par le Méthidathion (5mg/kg PC) pendant 28 jours

IM : Infiltration mononucléaire

☆ Hémorragie



E : Coupe histologique du foie (HE 100x) d'un rat traité par la combinaison Méthidathion + Sélénium+ Zinc (MD+Se+Zn) pendant 28 jours

IM : Infiltration mononucléaire

Figure 31. Coupes histologiques du foie de rat traité par le Méthidathion (5 mg/Kg PC) et par la combinaison Méthidathion+ Sélénium+ zinc colorés à Hématéine-Eosine 100X.

II. RESULTATS DE LA DEUXIEME EXPERIMENTATION

1. Etude phytochimique

1.1 Screening des composés phénolique d'*Artemisia campestris*

Le screening phytochimique nous a permis de mettre en évidence la présence de métabolites secondaires au niveau de la partie aérienne de notre plante. La détection de ces composés chimiques est basée sur des essais de solubilités des constituants, des réactions de précipitation et de turbidité et un changement de couleur spécifique.

Les résultats expérimentaux des tests phytochimiques réalisés sur l'extrait aqueux de la partie aérienne d'*Artemisia campestris* sont mentionnés dans le tableau 9, montrent la présence des flavonoïdes, des tanins, des saponosides, des stérols et des terpènes ainsi que la présence des cardénolides.

La mise en évidence des flavonoïdes dans l'extrait aqueux est confirmée par l'apparition d'une couleur rouge intense en contact avec la tournure de magnésium

Les tanins sont présents avec une intensité importante dans l'extrait aqueux. Sa présence est confirmée par une réaction positive avec la solution de chlorure ferrique donnant une coloration bleu verdâtre, il s'agit donc des tanins catéchiques.

Le test positif des stérols et des terpènes nous a montré leur présence dans la partie aérienne de la plante avec une apparition d'un anneau rouge brun et une couche surnageante de couleur verte. On remarque aussi la présence des saponosides et des cardénolides, mais avec une quantité faiblement importante.

Tableau 8 : Résultats des réactions de caractérisation des différents groupes chimiques recherchés dans la partie aérienne de la plante.

Groupes chimiques	Mise en évidence
Flavonoïdes	+++
Tanins catéchiques	+++
Tanins galliques	++
Terpènes et stérols	++
Saponosides	+
Cardénolides	+

Réaction fortement positive : +++ Réaction moyennement positive : ++

Réaction faiblement positive : +

1.2 Teneur en flavonoïdes, en tanins et en polyphénols de l'*Artemisia campestris*

A la lumière des résultats obtenus des teneurs en polyphénols, flavonoïdes et en tanins présentés dans la Figure 32, il ressort que la partie aérienne de la plante est riche en polyphénols de l'ordre de 49.6 ± 0.04 mg EQ/100g de matière sèche d'*Artemisia campestris*.

Concernant les teneurs en flavonoïdes et en tanins, il apparaît que l'EAQ de la plante possède un taux supérieur de flavonoïdes (29.8 ± 0.03 mg EQ /100g MS) par rapport à celui des tanins (20.52 ± 0.1 mg EQ/100g MS).

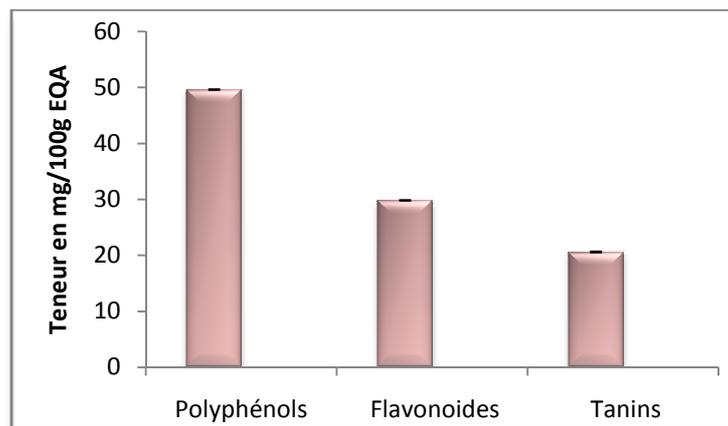


Figure 32. Teneurs en polyphénols, en flavonoïdes et en tanins de l'extrait aqueux d'*Artemisia campestris* (EQAC)

1.3 Activité antioxydante

L'activité antioxydante des extraits de polyphénols d'*Artemisia campestris* a été évaluée par deux tests in vitro, le DPPH[•] et l'ABTS.

L'effet scavenger de l'extrait vis-à-vis du radical DPPH[•] et/ou ABTS est exprimé par la concentration inhibitrice à 50 % (CI50) qui correspond à la concentration des polyphénols nécessaire pour inhiber ou réduire 50% de la concentration initiale du DPPH[•] et/ou ABTS. Une CI50 faible représente l'activité anti-radicalaire la plus élevée.

Les résultats présentés dans la Figure 4 de l'activité antiradicalaire de l'extrait aqueux de la partie aérienne d'*Artemisia campestris*, montrent un IC50% (ABTS) = 0.726 mg/ml, qui est plus élevée que celle enregistrée pour le DPPH qui est de : IC50% = 0.313 mg/ml, et de même pour l'acide ascorbique qui est de : IC50% = 0.03. (Figure 33).

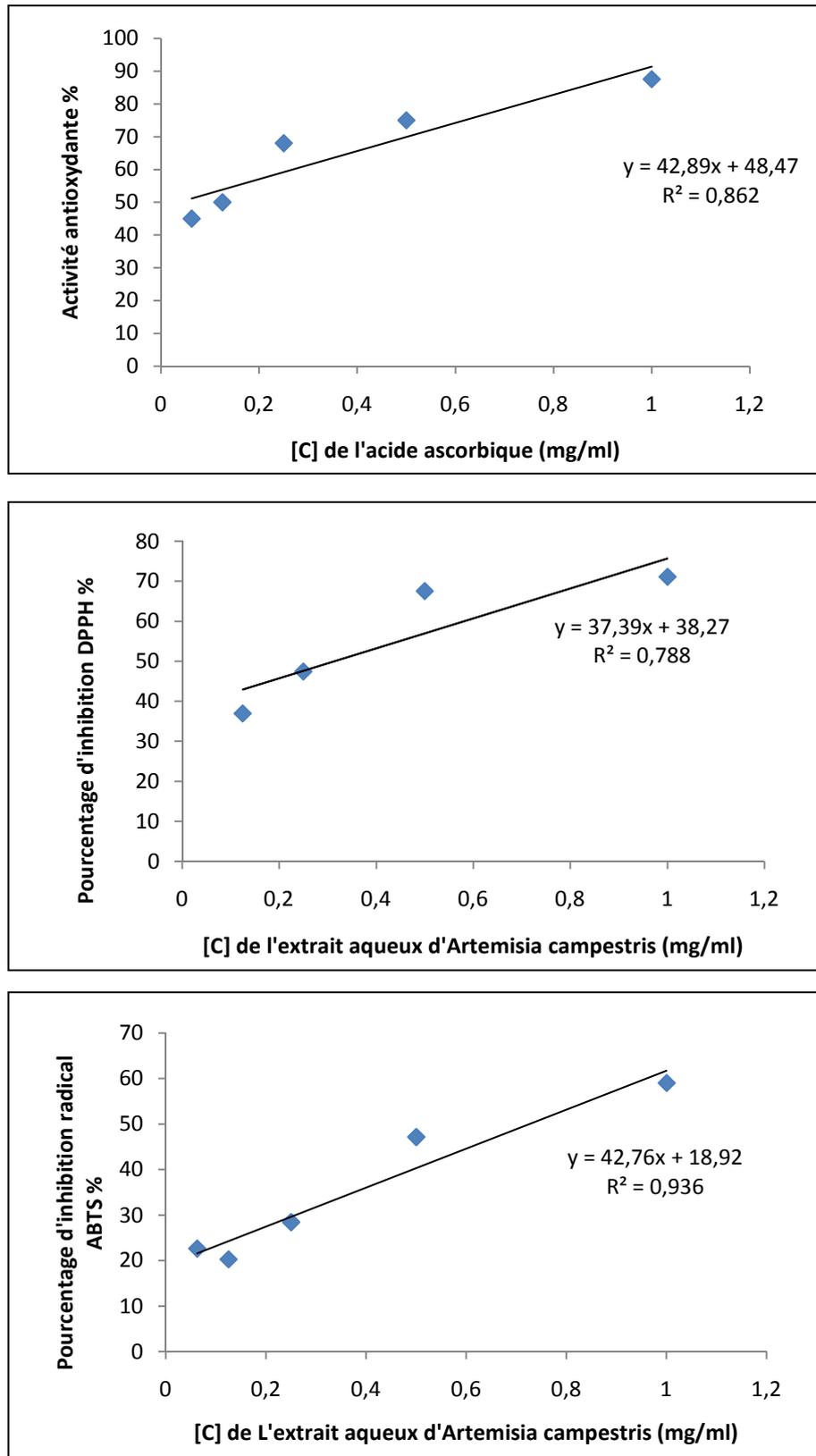


Figure 33. Activité anti-radicalaire en pourcentage de l'acide ascorbique et des extraits aqueux d'Artemisia campestris.

1.4 Mise en évidence de l'huile essentielle

Nos résultats révèlent que la partie aérienne de l'*Artemisia campestris* possède un pourcentage important de différents constituants chimiques dans l'huile essentielle de l'ordre de 96.0% dont les plus importantes sont indiquées dans le Tableau (10), notons : (α -pinene 20%, β -pinene 1.9%, Myrcene 8.3%, *p*-cymene 6.3%, Limonene 6.5%, (*Z*)- β -ocimene 6.8%, (*E*)- β -ocimene 3.6% et γ -terpinene 3%).

Tableau 9 : composition chimique de l'huile essentielle de la partie aérienne d'*Artemisia campestris*

No.	Constituants	RT (min)	Composition %
1	α-pinene	941	20,0
2	Sabinene	977	0,4
3	β -pinene	981	1,9
4	Myrcene	993	8,3
5	<i>p</i>-cymene	1028	6,3
6	Limonene	1032	6,5
7	(<i>Z</i>)-β-ocimene	1042	6,8
8	(<i>E</i>)- β -ocimene	1052	3,6
9	γ -terpinene	1063	3,0
10	terpinolene	1090	0,6

2. Etude biologique

2.1 Etude pondérale

2.1.1 Variation du poids corporel

Après 28 jours de traitement, nos résultats montrent une diminution significative ($p \leq 0.05$) du poids corporel chez les rats du lot traité par MD (-19.4%) comparativement aux rats du lot témoin. Parallèlement, la supplémentation de l'extrait aqueux d'AC a amélioré le gain du poids corporel par rapport aux rats du lot traité par MD de l'ordre de (+14.25 %) respectivement.

2.1.2 Variation de la consommation quotidienne d'aliment

Dans notre étude, les résultats montrent une diminution significative ($P \leq 0.05$) de la consommation quotidienne d'aliment chez le groupe de rats traités par MD (-2.08%) par rapport au groupe témoin. Tandis qu'on enregistre une augmentation significative ($p \leq 0.05$) chez le groupe de rats traités par MD+EQAC (+1.55%) comparativement au groupe de rats traités par MD.

2.1.3 Variation de la consommation quotidienne d'eau de boisson

Concernant la consommation quotidienne de l'eau de boisson, nos résultats révèlent une diminution significative ($p \leq 0.05$) de l'ordre de (-29.51%) chez le groupe traité par MD comparativement au groupe témoin. Par contre, on enregistre une augmentation hautement significative ($p \leq 0.01$) chez le groupe de rats traités par (EQAC+MD) comparativement au groupe de rats traités par MD, de l'ordre de (+25.77%) respectivement.

2.1.4 Variation du poids relatif de certains organes

Nous avons étudié la variation des poids relatifs (PR) des organes suivants : le foie, les reins et le cerveau chez les rats témoins et les rats traités par l'extrait aqueux d'*Artemisia campestris* (EQAC), le méthidathion (MD) et par MD + EQAC.

Dans notre étude, les résultats montrent une augmentation hautement significative ($p \leq 0.01$) du poids relatif du foie chez le lot traité par MD comparativement au lot témoin. Nos résultats montrent également une augmentation significative ($p \leq 0.05$) du poids relatif des reins et du cerveau chez le lot traité par MD par rapport au lot témoin. Par contre, une diminution considérable du poids relatif des organes étudiés est enregistrée après supplémentation de la combinaison (AC+MD).

Les résultats obtenus, dans le cadre de l'étude de la variation du poids corporel, de la consommation quotidienne d'aliment et de l'eau de boisson, ainsi que la variation du poids relatif des organes étudiés sont présentés dans les Figures 34, 35 et 36.

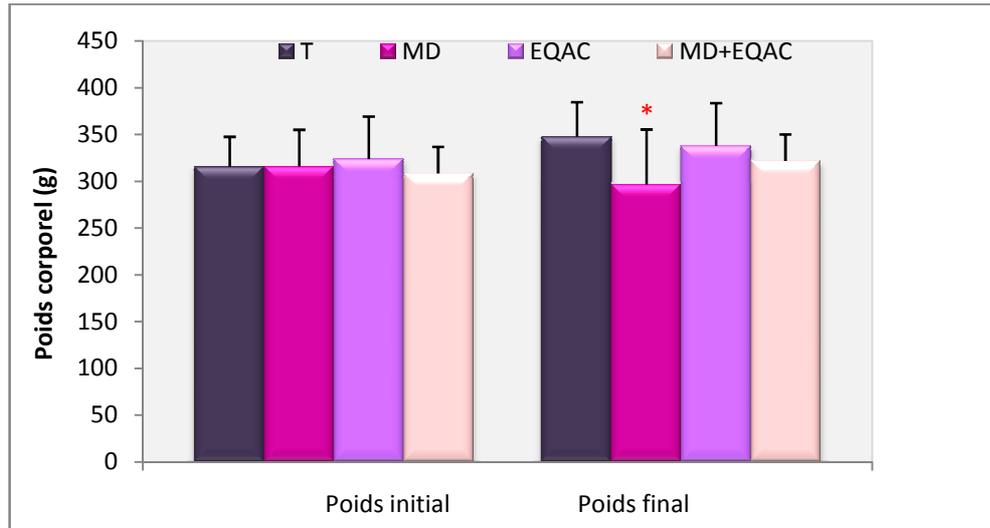


Figure 35. Variation de poids corporel (Poids initial et final en g) des rats témoins et traités; par le Méthidathion et l’EQAC et à la combinaison (Méthidathion/EQAC).

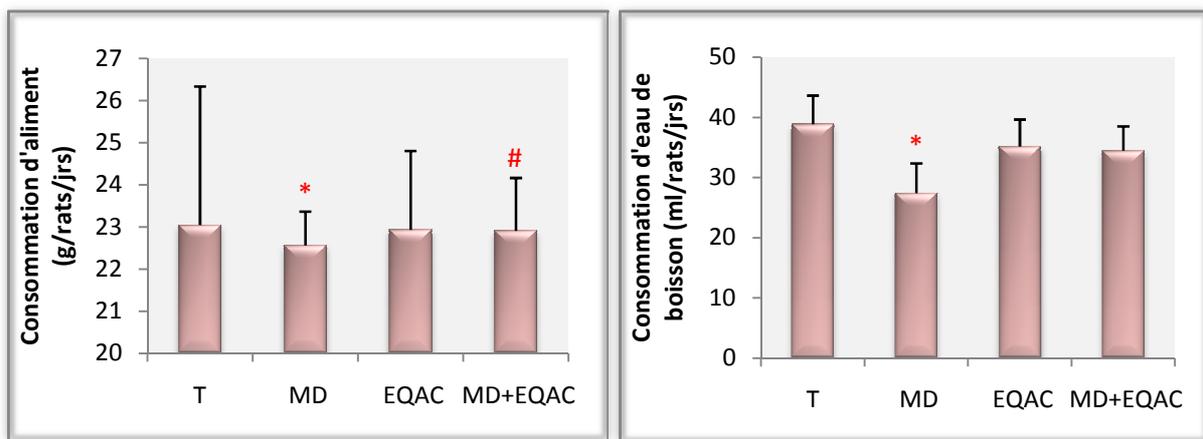


Figure 36. Variation de la consommation d’aliments (g/rats/jrs) et de la consommation d’eau de boisson (ml/rats/jrs) chez les rats témoins et les rats traités; par le Méthidathion et l’EQAC et à la combinaison (Méthidathion/EQAC).

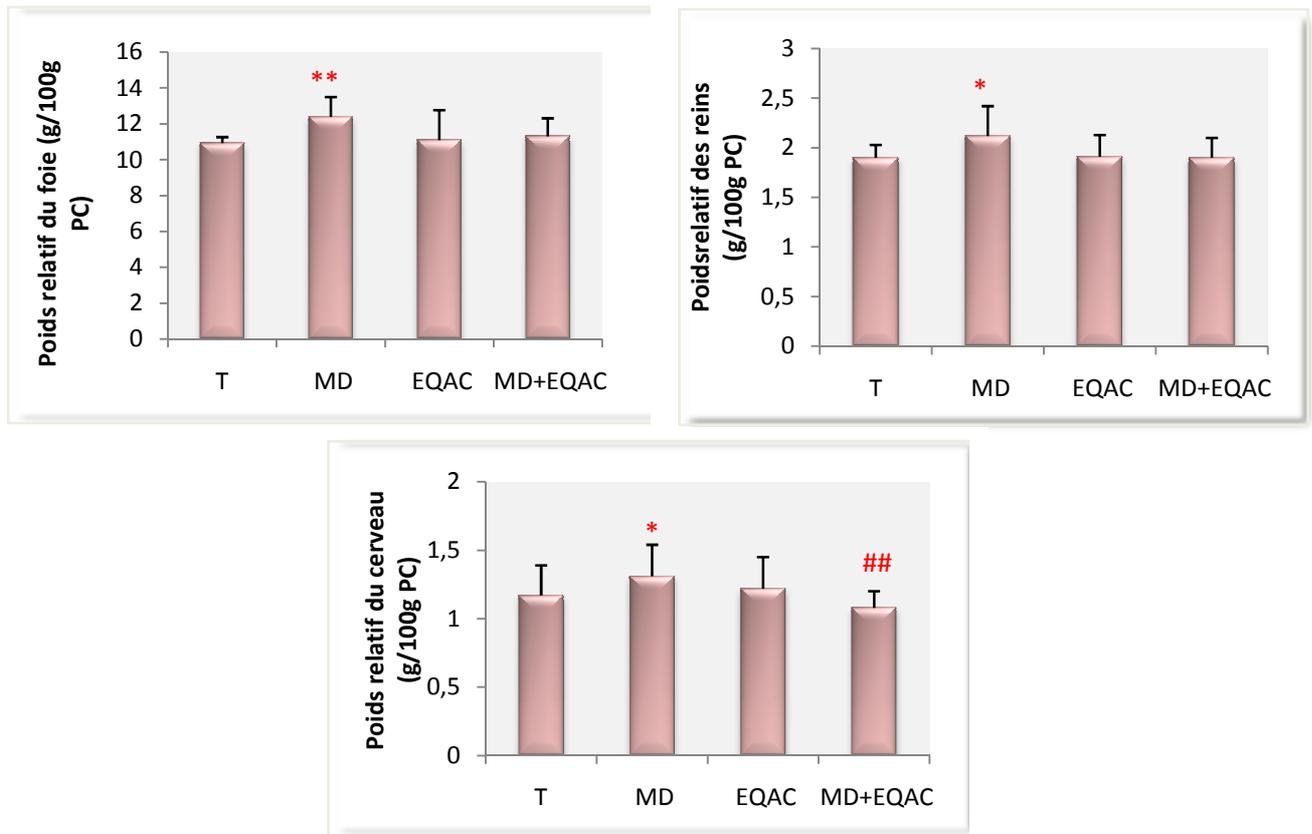


Figure 37. Variation de poids relatifs des organes : foie, reins et cerveau (g/100 g Pc) chez les rats témoins et les rats traités; par le Méthidathion et l'EQAC et à la combinaison (Méthidathion/EQAC).

2.2 Variation des paramètres hématologiques

Le Tableau 11 résume quelques paramètres hématologiques des rats témoins et des rats traités après 28 jours de traitement.

2.2.1 Nombre de globules rouges

D'après les résultats obtenus, nous enregistrons une diminution hautement significative du nombre de globules rouges ($p \leq 0.01$) de l'ordre de (-37.17 %) chez les rats traités par MD par rapport au groupe témoin. Par ailleurs, nous notons une augmentation considérable chez le lot traité par (MD+ EQAC) par rapport au lot traités par MD de l'ordre de (+32.19%).

2.2.2 Taux d'hémoglobine (Hb) et taux de plaquettes (Pt)

Les résultats obtenus montrent une diminution significative ($p \leq 0.05$) du taux d'hémoglobine de l'ordre de (-8.42%) et du taux de plaquettes de l'ordre de (-15.08%) chez les rats traités par MD par rapport au lot témoin. Par contre, la supplémentation de l'extrait

aqueux d'AC a amélioré le taux d'hémoglobine par une augmentation considérable et elle est significative ($p \leq 0.05$) en ce qui concerne le taux de plaquettes comparativement au témoin.

2.2.3 Volume globulaire moyen (VGM) et concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (CCMH)

Les analyses statistiques montrent qu'il n'y a pas eu de variations significatives de VGM et CCMH chez tous les groupes de rats traités comparativement aux rats témoins.

2.2.4 Taux d'hématocrite et nombre de globule blancs

Nos résultats montrent une augmentation hautement significative du taux d'hématocrite et du nombre de globules blancs chez les rats du lot traité par MD par rapport au lot témoin.

2.3 Effet sur la concentration sérique du fer

Nos résultats indiquent une augmentation hautement significative ($p \leq 0.01$) de la concentration du fer sérique chez le lot traité par MD par rapport au lot témoin de l'ordre de (+20.25%). Alors qu'on note une diminution significative pour le lot traité par MD+ EQAC par rapport au lot traité par MD. Voir Tableau 10

Tableau 10: Variation des paramètres hématologiques et de la concentration en fer sérique chez les rats témoins et les rats traités par le Méthidathion et l'EQAC et à la combinaison (Méthidathion/EQAC).

Paramètres	Lots expérimentaux			
	T	MD	EQAC	MD + EQAC
Globule rouge (x10⁶/μl)	6.74±0.60	4.10±0.60**	5.60 ± 0.70	5.42±1.20
%	-	-39.17	-	+32.19
Taux d'hémoglobine (g/dl)	9.50±1.30	8.70±2.14*	9.73±1.10	9.34±1.99
%	-	-8.42	-	+7.35
Plaquette (x10³/%)	355.10±32.23	298.32±19.45*	422.65±25.74	389.95±27.84
%	-	-15.98	-	+9.8
VGM (μ³)	50.04±1.10	50.50±0.80	50.50±0.90	50.63±1.62
%	-	-	-	-
CCMH (g/dl)	34.53±0.50	34.03±0.30	35.60±0.60	33.80±0.42
%	-	-	-	-
Taux d'hématocrite (%)	25.21±5.02	28.6±7.50	28.20±3.60	26.00±7.20
%	-	+13.44	-	-7.83
Globule blanc (x10³/%)	4.61±1.01	4.83±1.83	5.90±1.30	4.9±1.61
%	-	+4.54	-	+6.29
Fer sérique (μg/dl)	203,86±45,12	245,15±23,24**	237,63±85,64	222,50±24,22 [#]
%	-	+20.25	-	-9.24

*p≤ 0.05 ; **p≤ 0.01 ; ***p≤0.001 par comparaison avec les rats témoins.

[#]p≤0.05 ; ^{##}p≤0.01 par comparaison avec les rats traités par MD.

P : Seuil de signification

2.4 Variation des paramètres biochimiques

2.4.1 Concentration plasmatique en glucose

D'après les résultats obtenus, on observe une augmentation significative ($p \leq 0.05$) de la concentration plasmatique en glucose de l'ordre de (+4.67%) chez le groupe de rats traités par le Méthidathion(MD) comparativement au groupe témoin. Par contre, on enregistre un rétablissement par une diminution significative de la concentration plasmatique en glucose chez le lot traité par MD+ EQAC comparativement au lot traité par MD.

2.4.2 Concentration plasmatique en bilirubine directe

Les résultats obtenus montrent que l'administration de Méthidathion a induit une diminution significative de la concentration plasmatique de bilirubine directe ($p \leq 0.05$) de l'ordre de (-41.30%) chez les rats du lot traité par MD par rapport au lot témoin. Par contre, nos résultats montrent un rétablissement par une diminution significative chez le lot traité par MD+ EQAC par rapport au lot traité par MD.

2.4.3 Concentration plasmatique en cholestérol et triglycérides

Nos résultats révèlent une diminution significative du taux de cholestérol ($p \leq 0.01$), tandis qu'on enregistre une augmentation significative des triglycérides ($p \leq 0.05$) chez les rats du lot traité par MD par rapport au lot témoin. Par contre, le traitement des rats par la combinaison MD+ EQAC a entraîné une amélioration du taux de cholestérol et des triglycérides par rapport aux rats traités par le Méthidathion.

2.4.4 Effet sur l'activité des aminotransaminases

Comparativement au groupe témoin, le traitement des rats par MD induit une augmentation significative de l'activité enzymatique des transaminases, de l'alanine aminotransférase (ALAT) et de l'aspartate aminotransférase (ASAT) de l'ordre de (+40%) et (80.56%) respectivement. En revanche, on enregistre un rétablissement par une diminution significative de l'activité de l'ALAT et de l'ASAT chez le groupe traité par la combinaison MD+ EQAC par rapport au groupe de rats traité par MD.

2.4.5 Effet sur l'activité de la phosphatase alcaline (PAL)

Concernant l'activité enzymatique de la phosphatase alcaline, nos résultats révèlent une augmentation significative ($p \leq 0.001$) chez le lot traité par MD par rapport au lot témoin. Tandis qu'on enregistre une amélioration par une diminution considérable chez le lot traité par MD+ EQAC) comparativement au lot traité par MD.

2.4.6 Effet sur l'activité du lactate déshydrogénase (LDH)

Nos résultats indiquent une augmentation significative ($p \leq 0.01$) de l'activité enzymatique du lactate déshydrogénase chez le lot traité par MD comparativement au lot témoin. Cependant, le traitement des rats par MD + EQAC induit une baisse considérable de l'activité PAL comparativement au lot traité par MD de l'ordre de (- 1.39%).

2.4.7 Concentration plasmatique en urée et en créatinine

Comparativement au lot témoin, l'administration de Méthidathion provoque une augmentation significative du taux plasmatique de l'urée ($p \leq 0.01$) et de la créatinine ($p \leq 0.05$). Par contre, on note un rétablissement par une diminution significative de ce taux chez les rats traités par la combinaison MD+ EQAC comparativement au groupe de rats traités par MD.

Les résultats de la variation des paramètres biochimiques de la fonction hépatique et rénale chez les rats témoins et traités sont présentés dans le Tableau 11.

Tableau11: Variation de quelques biomarqueurs plasmatiques de la fonction hépatique et rénale chez les rats témoins et les rats traités par le Méthidathion et l'EQAC et à la combinaison (Méthidathion/EQAC).

Paramètres	Lots expérimentaux			
	T	MD	EQAC	MD + EQAC
Glucose (mg/dl)	1.07±0.52	1.12±0.57*	1.10±0.58	1.05±0.64
%	-	+4.67	-	-6.25
Bilirubine direct (mg/dl)	4.6±0.25	2.7±0.12*	3.37±2.82	2.0±0.0 [#]
%	-	-41.30	-	-25.92
Cholestérol (mg/dl)	2.09±0.35	1.7±0.32**	2.26±0.34	2.09±0.20 ^{##}
%	-	-18.66	-	+22.94
Triglycérides (mg/dl)	0.97±0.23	1.21±0.13*	0.72±0.26	0.90±0.34 [#]
%	-	+24.74	-	-25.62
ASAT (U/L)	191.12±6.02	267.57±6.35***	158.87±69.75	180.75±24.21 [#]
%	-	+40.00	-	-32.42
ALAT (U/L)	111.87±2.73	202±1.51**	112.87±16.68	101.63±10.84 ^{##}
%	-	+80.56	-	-49.81
PAL (U/L)	260.66±12.1	368.75±10.09***	363.62±164.29	363.62±54.85
%	-	+41.46	-	-1.39
LDH (U/L)	1827.26±63.82	2585±45.4**	1619.24±326	1480.57±329.8 [#]
%	-	+41.46	-	-42.72
Urée	6.27±0.54	7.12±0.48**	6.31±0.73	6.32±0.70 ^{##}
%	-	+11.93	-	-11.23
Créatinine	34.13±5.70	40.50±6.74*	35.38±6.60	39.60±3.30
%	-	+18.66	-	-2.22

*p≤ 0.05 ; **p≤ 0.01 ; ***p≤0.001 par comparaison avec les rats témoins.

[#]p≤0.05 ; ^{##}p≤0.01 par comparaison avec les rats traités par MD.

P : Seuil de signification

2.5 Etude de quelques paramètres du stress oxydatif

Les paramètres du stress oxydant (MDA, GSH, GPx, GST, SOD et CAT) dans les organes (foie, reins et cerveau) des rats témoins et les rats traités par le Méthidathion, et par la combinaison (Méthidathion/ EQAC) sont présentés dans les Figures 38, 39, 40, 41, 42 et 43.

2.5.1 Malondialdéhyde (MDA)

Selon les résultats obtenus, on constate que le traitement des rats par le Méthidathion provoque une augmentation significative ($p \leq 0.05$) du taux de malondialdéhyde dans les organes étudiés : foie (+22.68 %), reins (+32.03 %) et hautement significative dans le cerveau (+111 %). En revanche, la co-administration de l'extrait aqueux d'*Artemisia campestris* (EQAC) avec le Méthidathion (MD) a significativement réduit le taux de MDA dans les organes étudiés : Foie, reins et cerveau comparativement au groupe traité uniquement par le MD.

2.5.2 Glutathion réduit (GSH)

Le traitement des rats par le Méthidathion, à raison de 5 mg/Kg PC pendant 28 jours, entraîne une diminution de la teneur cellulaire en glutathion dans les organes. Elle est caractérisée par une diminution très hautement significative dans le foie (-33.07%), hautement significative dans les reins (-37.43%) et significative dans le cerveau de l'ordre de (-24.91 %). Tandis que la co-administration de la combinaison MD+ EQAC a significativement augmenté le taux de GSH dans les organes étudiés en comparaison avec le groupe traité uniquement par le Méthidathion (MD).

2.5.3 Les enzymes antioxydantes

2.5.3.1 Glutathion peroxydase (GPx)

D'après les résultats obtenus, on observe une diminution significative ($p \leq 0.05$) de l'activité enzymatique de la glutathion peroxydase (GPx) dans les organes étudiés : foie (-21.31 %), reins (-29.82 %) et une diminution hautement significative ($p \leq 0.01$) dans le cerveau (-58.66 %). En revanche, on enregistre une amélioration significative de l'activité de la GPx dans les organes étudiés chez les rats traités par MD+ EQAC en comparaison avec le groupe traité uniquement par le Méthidathion.

2.5.3.2 Glutathion - S- transférase (GST)

L'administration du Méthidathion, à une dose de 5 mg/Kg PC pendant 28 jours, entraîne une diminution significative ($p \leq 0.05$) de l'activité enzymatique de la glutathion-s-transférase (GST) dans les organes étudiés : foie (-18.84 %), reins (-21.03 %) et cerveau (-27.84 %). Tandis qu'on enregistre une amélioration par une augmentation significative de

l'activité de la GST dans les organes étudiés du groupe traité MD + EQAC par rapport au groupe traité uniquement par le Méthidathion.

2.5.3.3 Superoxydedismutase (SOD)

D'après nos résultats, on enregistre une diminution significative ($p \leq 0.05$) de l'activité enzymatique de la superoxyde dismutase (SOD) dans le foie (-25.73%), tandis qu'on note une augmentation hautement significative ($p \leq 0.01$) dans les reins (+83.19%) et le cerveau (+72.89%). Par contre, la perturbation de l'activité enzymatique de la SOD tissulaire est corrigée après le traitement des rats par la co-administration de l'extrait aqueux d'*Artemisia campestris* (EQAC) avec le Méthidathion.

2.5.3.4 Catalase (CAT)

Le traitement des rats par le Méthidathion, à raison de 5 mg/Kg PC, induit une diminution significative ($p \leq 0.05$) de l'activité enzymatique de la catalase dans les organes étudiés : foie (-15.73%), reins (-63.24%) et cerveau (-28.16%) comparativement au groupe témoin. Cependant, on enregistre, chez le groupe traité par l'extrait d'AC avec le Méthidathion, un rétablissement de cette activité dans les organes étudiés par rapport au groupe traité uniquement par le MD.

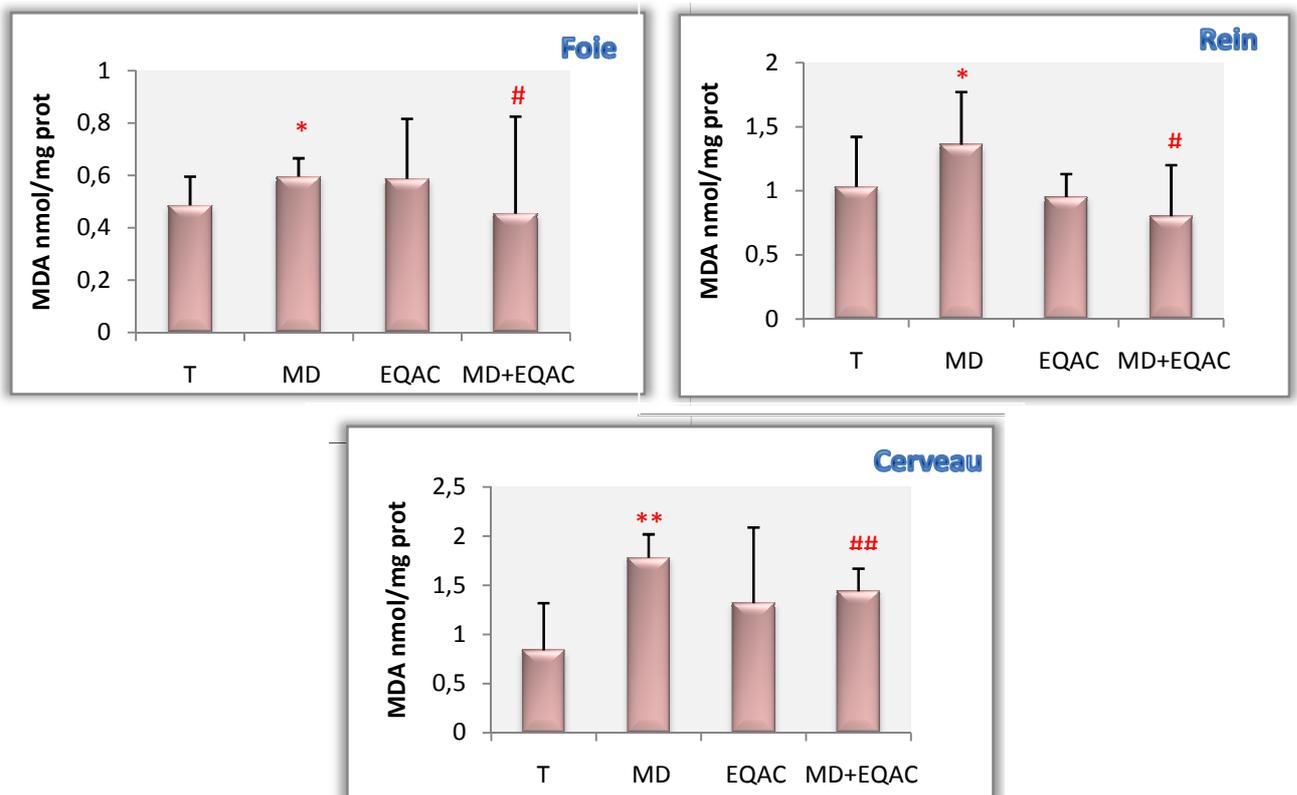


Figure 38. Taux de malondialdéhyde (MDA) (nmol /mg prot) dans les organes (foie, reins et cerveau) chez les rats témoins et les rats traités par le Méthidathion et l'EQAC et à la combinaison (Méthidathion/EQAC).

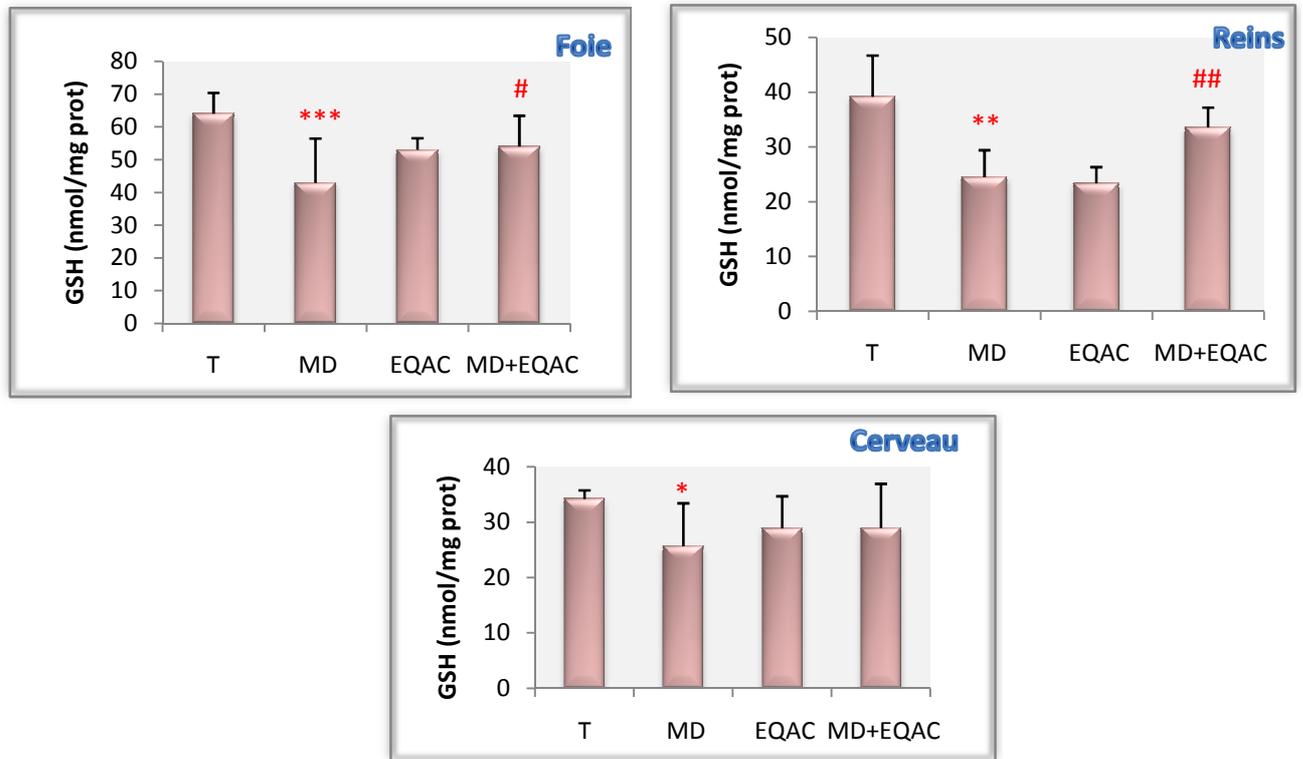


Figure 39. Concentration du GSH (nmol /mg prot) dans les organes (foie, reins et cerveau) chez les rats témoins et les rats traités par le Méthidathion et l'EQAC et à la combinaison (Méthidathion/EQAC).

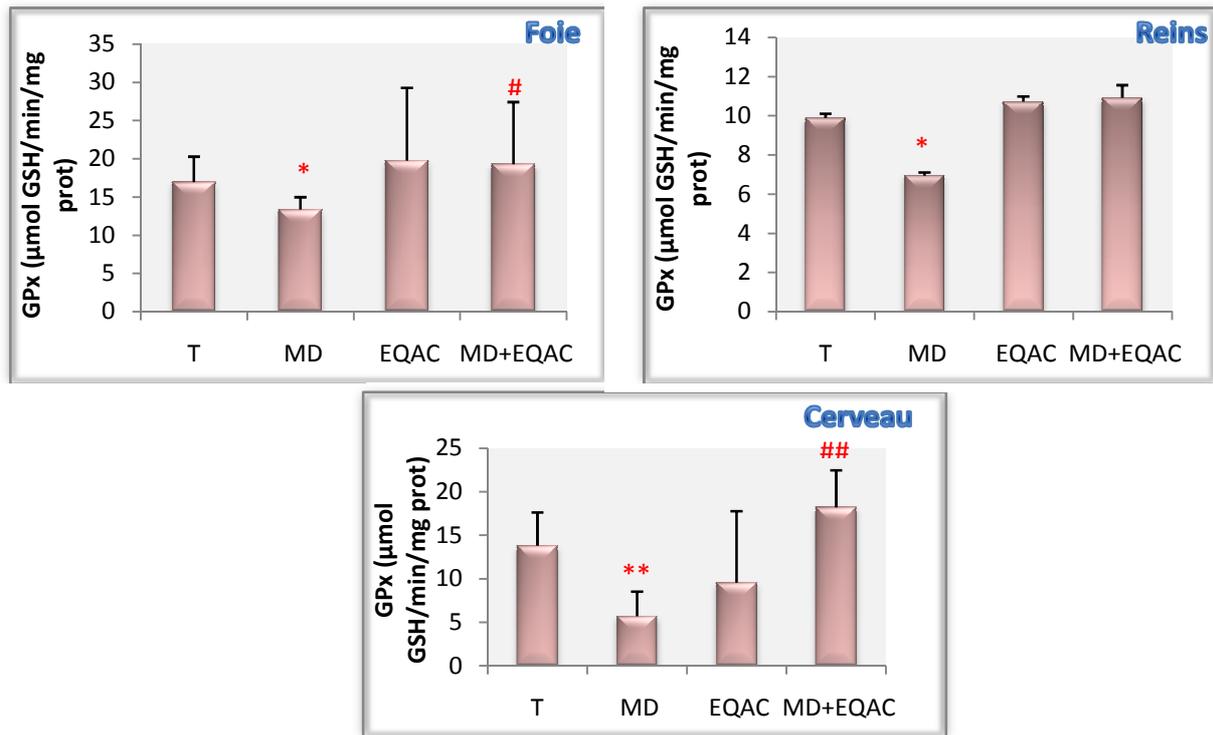


Figure 40. Variation de l'activité enzymatique Glutathion peroxydase ($\mu\text{mol GSH}/\text{min}/\text{mg prot}$) dans les organes (foie, reins et cerveau) chez les rats témoins et les rats traités; par le Méthidathion et l'EQAC et à la combinaison (Méthidathion/EQAC).

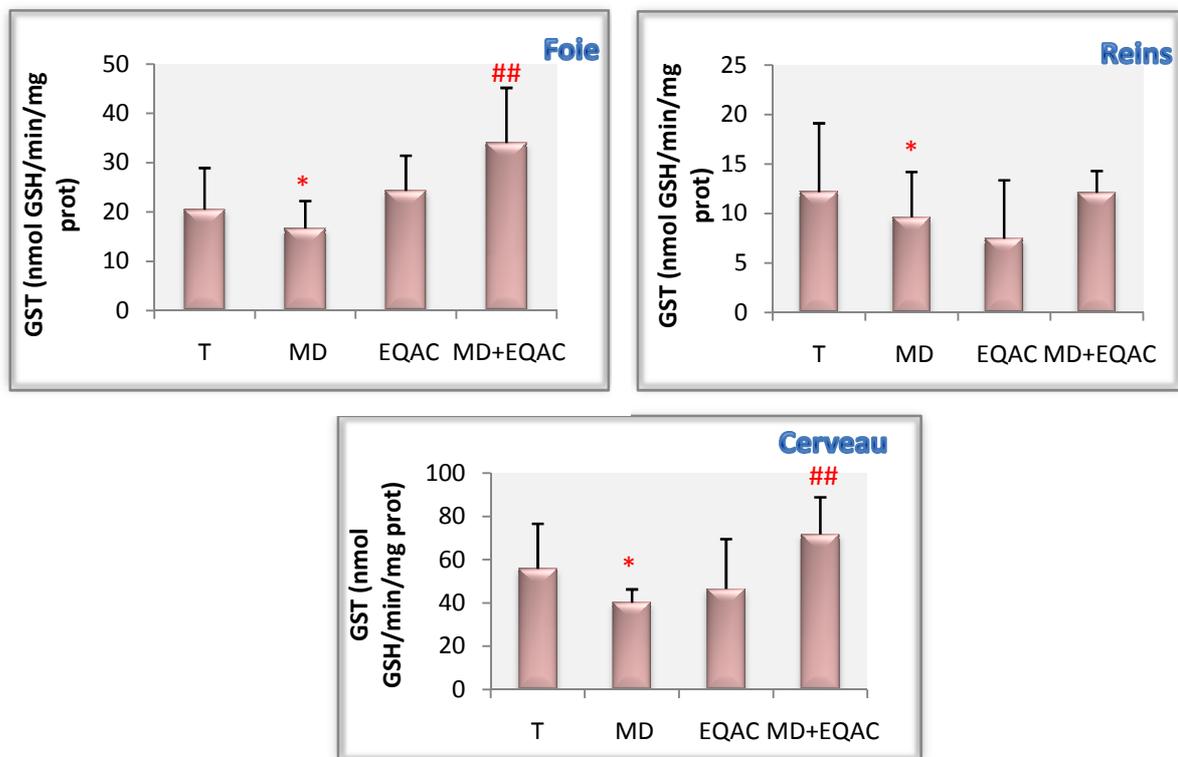


Figure 41. Variation de l'activité enzymatique Glutathion-S-transférase ($\text{nmol GSH}/\text{min}/\text{mg prot}$) dans les organes (foie, reins et cerveau) chez les rats témoins et les rats traités; par le Méthidathion et l'EQAC et à la combinaison (Méthidathion/EQAC).

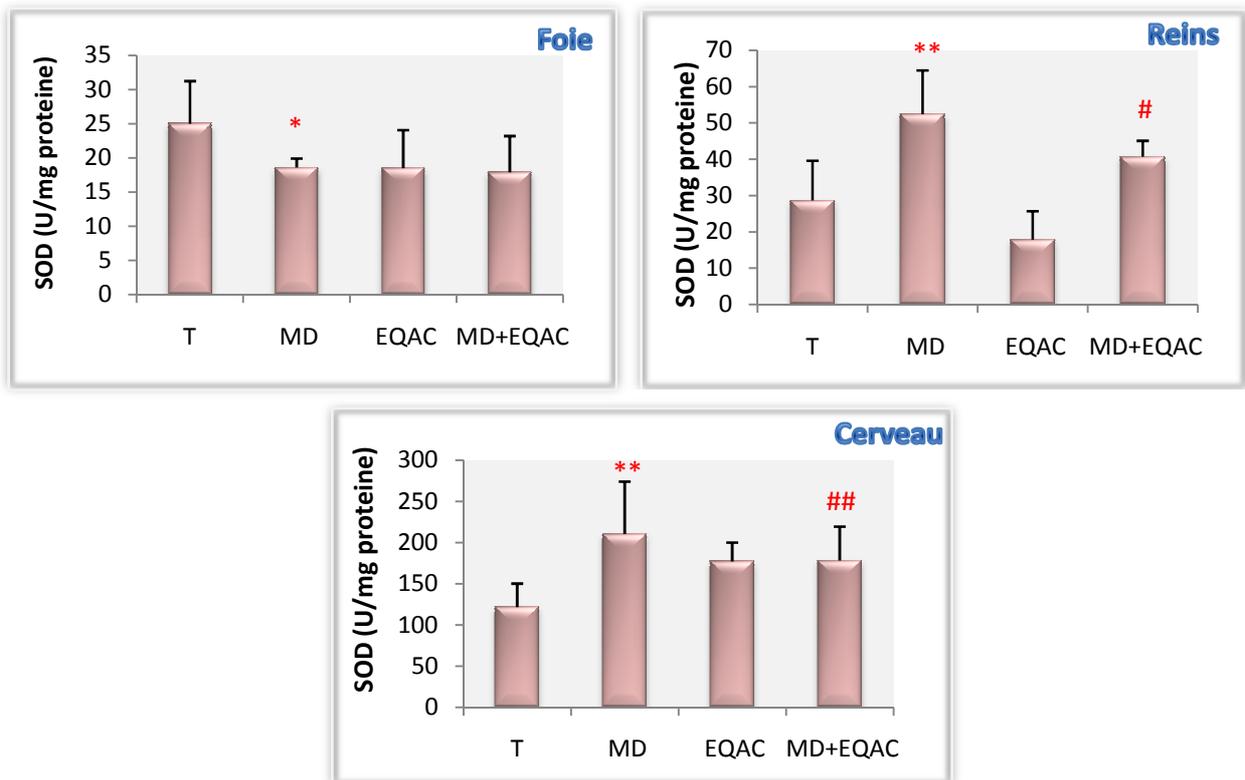


Figure 42. Variation de l'activité enzymatique de la superoxydedismutase (U/mg prot) dans les organes (foie, reins et cerveau) chez les rats témoins et les rats traités; par le Méthidathion et l'EQAC et à la combinaison (Méthidathion/EQAC).

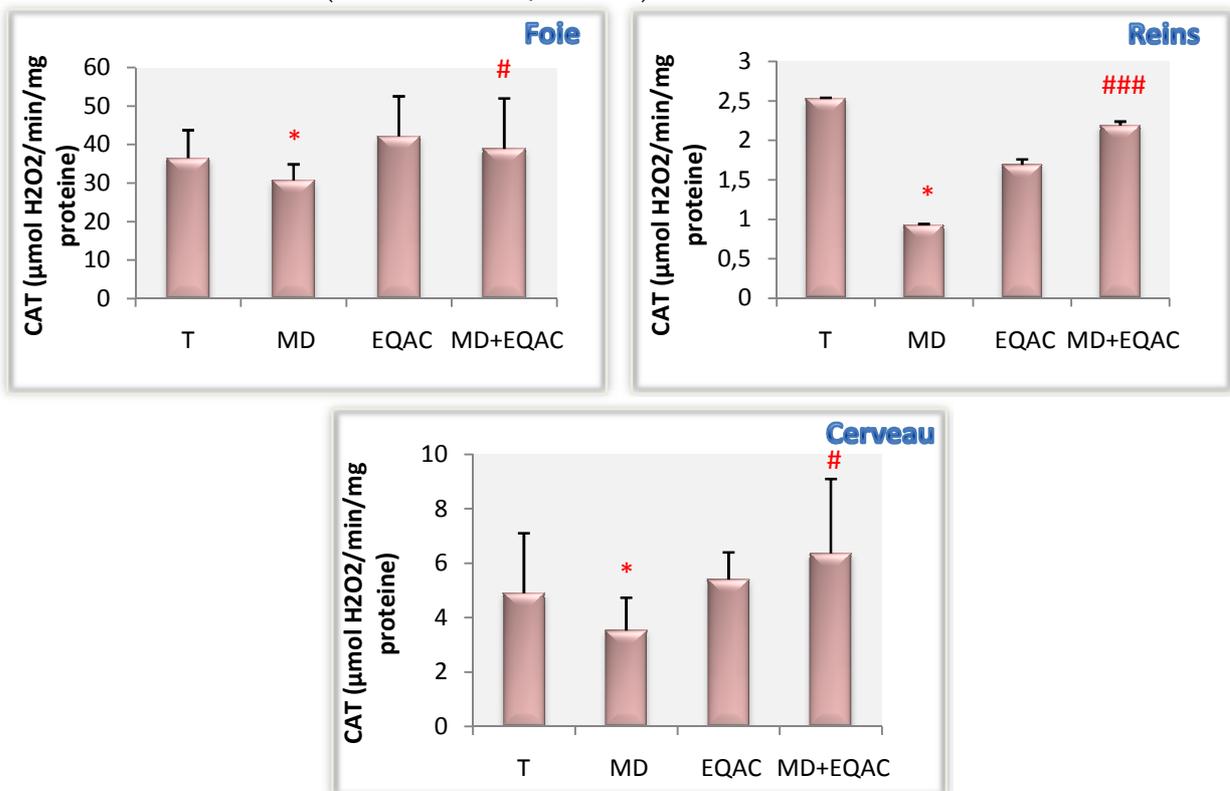


Figure 43. Variation de l'activité enzymatique de la catalase ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{min}/\text{mg prot}$) dans les organes (foie, reins et testicules) chez les rats témoins et les rats traités; par le Méthidathion et l'EQAC et à la combinaison (Méthidathion/EQAC).

2.6 Effet sur l'activité acétylcholinestérase cérébrale

La variation de l'activité de l'acétylcholinestérase (AChE), au niveau cérébral des rats témoins et des rats traités par le Méthidathion et par la combinaison MD+ EQAC après 28 jours de traitement, est montrée dans la figure 44.

Les résultats obtenus montrent que l'administration du Méthidathion, à raison de 5 mg/Kg PC, entraîne une diminution significative de l'activité enzymatique de l'acétylcholinestérase (AChE) dans le cerveau des rats traités par le Méthidathion par rapport au groupe témoin. Par contre, on enregistre un rétablissement par une augmentation significative chez le groupe de rats recevant l'extrait aqueux d'AC comparativement au groupe de rats recevant uniquement le Méthidathion.

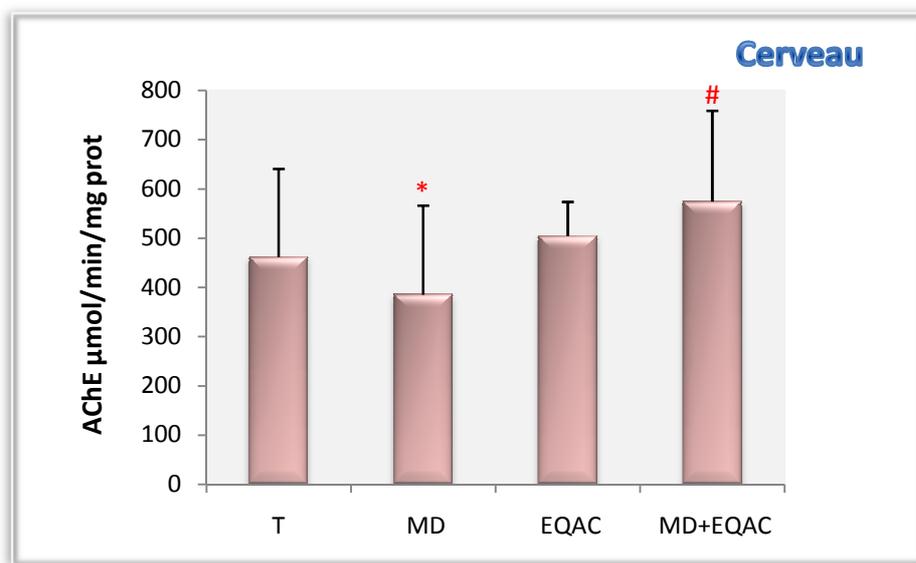


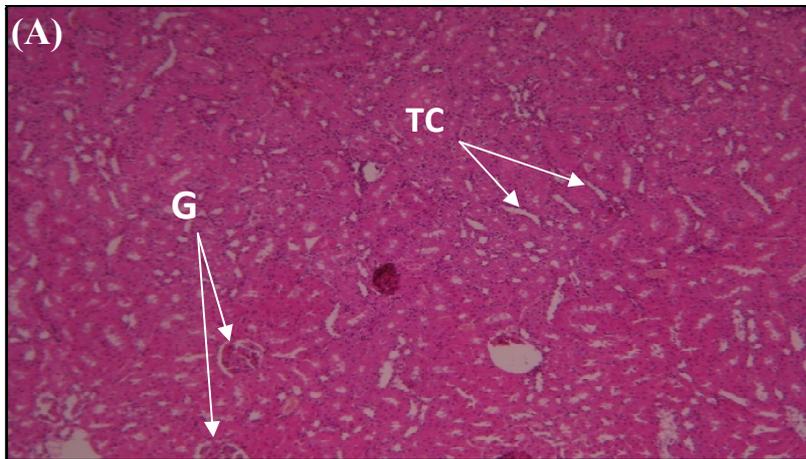
Figure 44. Variation de l'activité enzymatique de l'acétylcholinestérase dans le cerveau chez les rats témoins et les rats traités par le Méthidathion et l'EQAC et à la combinaison (Méthidathion/EQAC).

2.7 Effet sur l'histoarchitecture des reins

L'observation microscopique du rein des rats témoins indique la présence de structures denses et arrondies, nommés les glomérules. Ils sont entourés d'un espace étroit clair, la chambre glomérulaire ou espace de Bowman et entourés aussi d'un grand nombre de tubes, principalement des tubes contournés proximaux. Voir Figure 46 A et B.

Dans notre étude, l'administration de Méthidathion (5mg/Kg PC) provoque des modifications au niveau de l'histoarchitecture des reins caractérisé par, une hémorragie, congestion vasculaire, dilatation tubulaire, sclérose de glomérule et nécrose des cellules épithéliales de tube contourné proximal. Voir Figure 47 C et D.

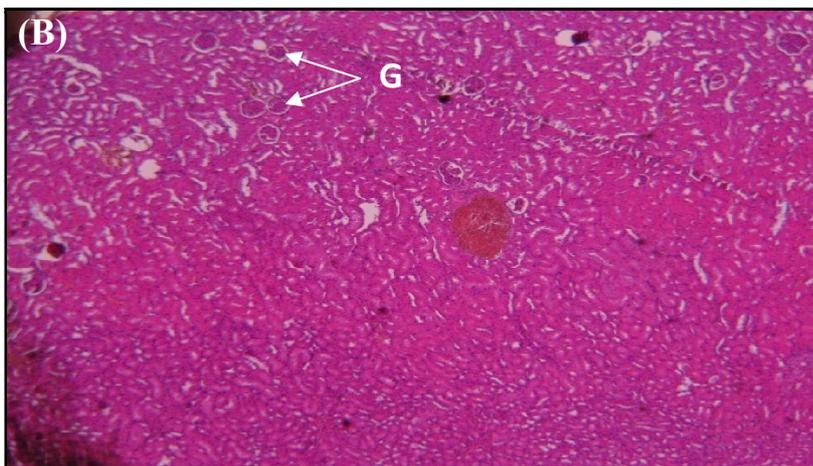
En revanche, on observe une protection partielle chez les rats traités par la combinaison MD + EQAC comparativement au groupe de rats traités par le Méthidathion uniquement. Voir Figure 47 E.



A : Coupe histologique du rein (HE x100) d'un rat témoin

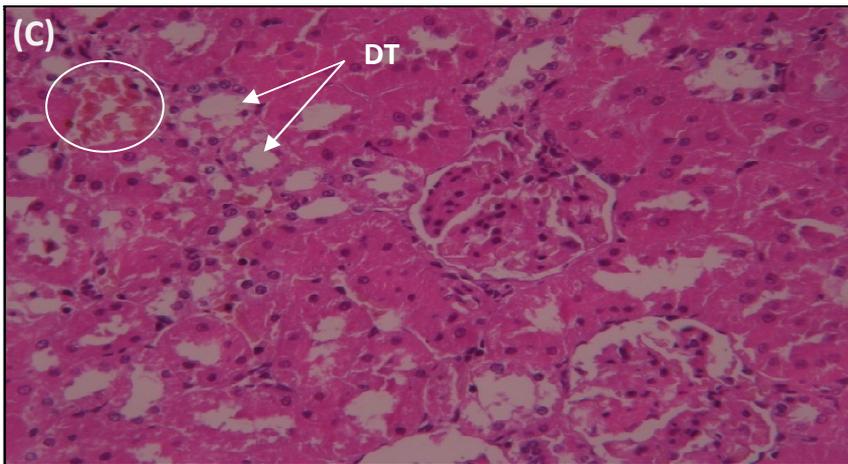
G : Glomérule

TC : Tube contournée



B : Coupe histologique du rein (HE 100x) d'un rat traité pendant 28 jours par l'extrait aqueux d'*Artemisiacampestris*(EQAC)

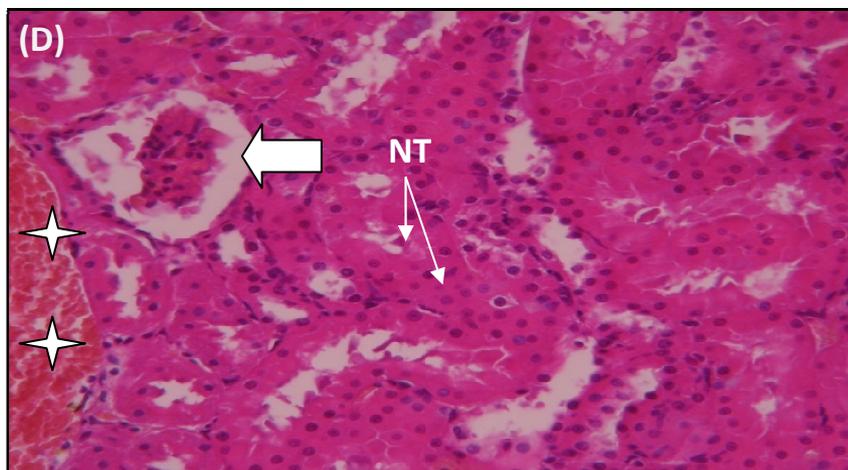
Figure 46. Coupes histologiques des reins de rat témoin et traités par l'extrait aqueux d'*Artemisiacampestris* colorés à Hématéine-Eosine 100X.



C : Coupe histologique des reins (HE 100x) d'un rat traité par le Méthidathion (5mg/kg PC) pendant 28 jours

DT : Dilatation tubulaire

○ Hémorragie

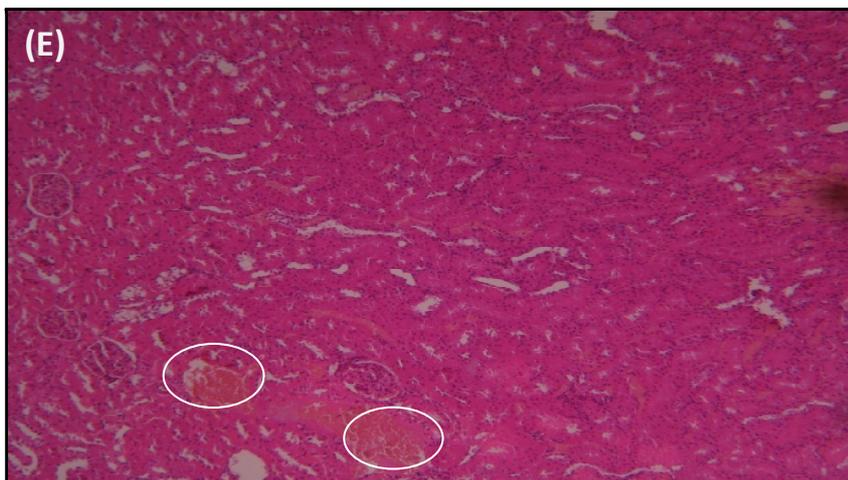


D : Coupe histologique des reins (HE 100x) d'un rat traité par le Méthidathion (5mg/kg PC) pendant 28 jours

NT : Nécrose tissulaire

← Sclérose glomérulaire

☆ Congestion vasculaire



E : Coupe histologique des reins (HE 100x) d'un rat traité par la combinaison Méthidathion + Extrait aqueux d'Artemisiacampestris pendant 28 jours

○ Hémorragie

Figure 47. Coupes histologiques des reins de rat traité par le Méthidathion (5 mg/Kg PC) et par la combinaison Méthidathion/Extrait aqueux d'Artemisiacampestris colorés à Hématéine-Eosine 100X.

DISCUSSION

I. Évaluation des effets cytotoxiques du Méthidathion chez les rats wistar : effet sur la variation des paramètres hématologiques, biochimiques, histopathologiques et sur le statut du stress oxydatif

D'après la littérature, l'exposition aux agents environnementaux peut mener aux concentrations significatives des espèces réactives de l'oxygène, plus particulièrement dans le cerveau (Migliorea et Coppedè, 2009). Le cerveau représente le tissu le plus vulnérable au stress oxydant. D'une part, en raison de sa consommation accrue de l'oxygène (O₂) ce qui provoque une génération d'un grand nombre de ROS. D'autre part, il est caractérisé par une activité inférieure des enzymes antioxydantes tels que : la catalase et la glutathion peroxydase. De même, le cerveau est riche en acides gras polyinsaturés qui sont fortement susceptibles à la peroxydation lipidique (Mariani et al., 2005).

Les insecticides organophosphorés (OPIs) sont connus par leurs inhibitions irréversibles de l'acétylcholinestérase (AChE) dans le plasma, les érythrocytes et le cerveau, provoquant ainsi une accumulation de l'acétylcholine au niveau des récepteurs cholinergiques muscarinique et nicotinique. Les OPIs affectent également certains processus biochimiques tels que la respiration mitochondriale, le métabolisme des glucides et la biosynthèse des protéines (Gupta et al., 1991 ; Holmuhamedov et al., 1996).

Gültekin et ses collaborateurs (2000), ont montré que l'exposition prolongée aux trois insecticides (diazinon, chlorpyrifos et méthidathion) chez les rats mâles provoquent la production accrue des espèces réactives de l'oxygène ce qui conduit à une altération des mécanismes de défense antioxydants, ainsi que la peroxydation lipidique de la membrane cellulaire. Une autre étude similaire réalisée par John et al. (2001), indique que l'exposition chronique aux insecticides (malathion et diméthoate) engendre une peroxydation lipidique dans les érythrocytes, une augmentation de l'activité enzymatique (Catalase et superoxyde dismutase). Cependant, la supplémentation de la vitamine E entraîne une amélioration des mécanismes de défense enzymatique.

Nos résultats obtenus montrent que l'administration de Méthidathion entraîne des perturbations de certains facteurs de croissance que ce soit dans la première ou la deuxième expérimentation. Ces perturbations sont caractérisées par une diminution du poids corporel des rats traités par rapport aux rats témoins. Cette diminution est accompagnée d'une

diminution significative de la consommation quotidienne d'aliment et d'eau de boisson et d'une augmentation des poids relatifs des organes étudiés (foie, reins, cerveau et testicules) chez les rats traités par le Méthidathion comparativement aux rats du lot témoin.

D'une manière globale, la diminution du poids corporel peut être expliquée par la diminution de la consommation quotidienne d'aliment suite à l'intoxication par le Méthidathion et/ou la malabsorption des nutriments suite aux effets néfastes du MD sur le tractus gastro-intestinal. Nos résultats concordent avec d'autres travaux réalisés par Guney et al. (2007), qui ont montré que la croissance corporelle est affectée suite à l'intoxication par le Méthidathion. Tandis que l'augmentation des poids relatifs des organes étudiés peut être due à une inflammation provoquée par le Méthidathion. Ce dernier, peut agir avec les groupements thiols (-SH) et hydroxyle (-OH) des protéines ainsi que les acides gras insaturés des lipides par le biais des radicaux libres provoquant ainsi des effets délétères.

Nos résultats montrent également que le traitement des rats par le Méthidathion, provoque des perturbations hématologiques marquées par une diminution importante des globules rouges, d'hémoglobine, d'hématocrite, des plaquettes et par une augmentation considérable des globules blancs d'une part et par aucune différence significative de CCMH et VGM d'autres part. Ces perturbations prouvent que cet insecticide suscite a un effet hématotoxique, il s'agit d'une anémie hémolytique.

Cette anémie est probablement due aux effets des radicaux libres sur les parois des globules rouges, augmentant ainsi la peroxydation des lipides membranaire ce qui provoque l'hémolyse des érythrocytes. Nos constatations sont en accord avec celle de Ojezele et Abatan, (2009). De plus en présence de forte concentration des xénobiotique, l'hémoglobine représente la source majeure de la production des radicaux libres donnant naissance au radical superoxyde et peroxyde d'hydrogène (French et al., 1978).

Au regard des résultats obtenus, il en ressort que le Méthidathion entraîne des perturbations au niveau des paramètres biochimiques et enzymatiques. Ces paramètres sont utilisés comme biomarqueurs et peuvent constituer un important outil de diagnostic pour évaluer l'exposition et les effets des xénobiotiques. Ces perturbations se traduisent par l'augmentation de l'activité enzymatique des transaminases (ASAT et ALAT), de la phosphatase alcaline, qui sont des biomarqueurs de la fonction hépatique d'une grande importance (Klaassen et Watkin, 1984). L'atteinte hypatocytaire peut être expliquée par l'hépatotoxicité du Méthidathion fortement liée à ses effets prooxydants. Il semble que le MD inhibe la voie de phosphorylation oxydative, provoquant ainsi des lésions au niveau des

membranes hépatocytaires qui déversent leur contenu dans le sang tels que les transaminases et la phosphatase alcaline (Sefi et al, 2011 ; Attia et al, 2012 ; Etemad et al, 2014).

Lactate déshydrogénase (LDH) est une enzyme cytoplasmique présente au niveau de plusieurs organes et tissus. L'apparition extracellulaire de la LDH détecte la présence des dommages cellulaires (Kumar, 2016). En effet, la LDH joue un rôle principal dans la voie glycolytique de la cellule, elle catalyse l'oxydation réversible de L-Lactate en pyruvate en présence de Nicotinamide adénine dinucléotide (NAD^+), ce dernier est un accepteur d'hydrogène dans l'étape finale de la glycolyse anaérobique.

Dans notre étude nous avons enregistré une augmentation de l'activité enzymatique de la LDH, cela est peut être due à l'effet du Méthidathion qui inhibe l'acétylcholinestérase provoquant ainsi une hyperstimulation des récepteurs cholinergique qui à son tour provoque une diminution de l'ATP et de phosphocréatine (Milatovic et al., 2006), ce qui conduit à une augmentation de la glycolyse, par conséquent une augmentation de l'activité de la LDH. Cette dernière représente un mécanisme compensateur afin de maintenir une homéostasie de la concentration en acide pyruvique et d'autres métabolites de la glycolyse. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Gupta et al., (1991) et Eldemerdash, (2011) qui ont constaté dans leurs travaux une augmentation de l'activité des isoenzymes de la LDH dans différents parties du cerveau chez les rats traités par le carbamate (carbufuran) et par les pyrethrinoides respectivement. Ces altérations biochimiques sont clairement corrélées avec des perturbations histopathologiques au niveau du foie. Ce dernier, est responsable de la plupart des réactions de transformation de composés toxiques en dérivés moins nocifs (Dadoun, 2000). Des études récentes réalisées par Gokalp et al., (2003) ; Yavuz et al., (2004) ; Sulak et al, (2005) et Guney et al., (2007) indiquent que l'exposition chronique aux insecticides notamment le Méthidathion peut engendrer des lésions tissulaires et des changements histologiques au niveau du foie, de l'ovaire, du cœur et des reins. Dans notre étude, les altérations histologiques du foie sont révélées par une congestion vasculaire, une infiltration mononucléaire, une hémorragie et une nécrose tissulaire. Ce changement tissulaire peut être expliquer par le fait que la molécule du Méthidathion avec son caractère hydrophobe se combine d'une manière extensive au membranes biologique particulièrement au niveau de la bicouche lipidique et donc il est à l'origine d'une augmentation du taux des ROS et de la peroxydation lipidique (Kalender et al., 2005).

A l'issue de cette présente étude, on enregistre une hyperglycémie significative chez les rats traités par le Méthidathion. Cette augmentation est probablement liée aux effets

cytotoxiques du Méthidathion, ce qui mène à une multitude de dysfonctions métaboliques comme l'insulinorésistance (Santure et al., 2002). Cette insulinorésistance provoque à la fois une inhibition de la pénétration du glucose dans les tissus qui en besoin, soit suite à une diminution de la réponse à l'insuline au niveau des cellules insulinosensibles ou bien suite à une diminution de la stimulation du captage de glucose par l'insuline. (Baudler et al., 2003). Selon les travaux de *Matin et al.*, (1989), l'augmentation du taux de glucose enregistrée dans notre expérimentation peut-être la conséquence de l'effet inhibiteur de l'insecticide sur l'activité cholinestérase, d'où l'accumulation de l'acétyl choline au niveau des sites neurologiques, cette accumulation a un effet stimulateur sur l'adéno hypophyse en libérant l'ACTH, ce dernier stimule la glande surrénale et donc la sécrétion des corticostéroïdes : adrénaline et noradrénaline, influençant le métabolisme glucidique.

La bilirubine est le produit final résultant du catabolisme d'hémoglobine (González et al., 2007). En effet, la bilirubine piège l'oxygène singulet et de radicaux peroxydes RO_2^{\bullet} et protège ainsi l'albumine et les acides gras qui y sont associés à des attaques radicalaires (Thérond et al., 2005). D'après nos résultats, nous avons enregistré une diminution significative du taux de la bilirubine, cette diminution peut être expliquée par l'utilisation de la bilirubine en tant que composé antioxydant dans l'organisme vivant.

Une augmentation des triglycérides (hypertriglycémie) et une diminution du cholestérol (hyporcholestérolémie) a été notée au niveau du plasma des rats traité par le Méthidathion comparativement aux lots témoins. En générale, la quantité total du cholestérol présente dans l'organisme dépend du taux d'excrétion dans la bile, sous forme de cholestérol ou de sel biliaire et du taux de synthèse hépatique, celui-ci est régulé via une enzyme cytosolique la hydroxy-méthyle-glutaryl-CoA (Campbell et Smith, 2002). Cette perturbation peut être attribuée d'une part aux effets des pesticides sur la perméabilité de la membrane cellulaire du foie et/ou au dysfonctionnement hépatique (Yousef et al., 2003). Et d'autre part, à l'effet du MD en inhibant l'enzyme clé dans la production du cholestérol décrit précédemment.

Dans le présent travail, une augmentation des taux sériques en urée et en créatinine est observée chez les rats traités par le Méthidathion comparativement aux rats témoins. Cette augmentation peut être due soit à une augmentation du catabolisme protéique, ou à une augmentation de la glycation des protéines qui peuvent entraîner une atrophie musculaire accompagnée d'une libération accrue de la purine (El-Demerdash, 2004 ; Kumar et al., 2009). Cependant, ces deux paramètres représentent un bon biomarqueur du dysfonctionnement

rénale. Ces modifications biochimiques sont confirmées par les données histologiques. En effet, ces altération biochimique est clairement révélée au niveau des coupes histologiques des reins, caractérisé par une hémorragie, une infiltration leucocytaire et une nécrose des cellules épithéliales de tube contournée proximal (Sulak et al., 2005 ; Stevens et Lowe, 2006).

Le système de défense antioxydant présent dans toutes les cellules aérobies, neutralisant les réactions chimiques intermédiaires produites par voie endogène et/ou par voie exogène (Winston, 1991). L'une des réactions majeure de la détoxification assurant la protection de l'organisme vivant est la conjugaison avec le groupement thiol (-SH) du glutathion (GSH), un tripeptide appartient à la classe des petites molécules intracellulaires les plus abondantes. En outre, il entre dans la régulation de cycle cellulaire et dans l'expression des gènes. De même, le glutathion est un réducteur physiologique responsable de maintenir le statut redox intracellulaire (Dale et al., 2006).

Dans le cadre de la première et la deuxième expérimentation, nos résultats révèlent une diminution significative de la teneur en glutathion au niveau des organes étudiés après administration du Méthidathion 5 mg/Kg PC comparativement aux lots témoins. Nos constatations sont en accord avec celles de Cemek et al., (2010) concernant l'altération du statut pro/antioxydant des rats traités par les organophosphorés.

La peroxydation lipidique (LPO) est l'une des principales conséquences des dommages oxydatifs provoqués par la toxicité de plusieurs xénobiotiques. La LPO est le processus de la dégradation oxydative des acides gras polyinsaturés. En effet, son occurrence dans les membranes biologiques cause des changements dans la structure et dans la fonction membranaires et mène alors à la diminution de la fluidité membranaire et l'inactivation de plusieurs enzymes membranaires (Gutteridge et Halliwell, 2000). Le degré de la LPO est mesuré en termes de malondialdéhyde (MDA), produit final de la LPO. Dans la présente étude, l'augmentation du taux de MDA est observée au niveau des organes étudiés chez les rats traités par le Méthidathion. Ces résultats concordent avec les expérimentations de Altuntas et al., (2002) et Yavuz et al., (2004), qui ont enregistré une augmentation du taux de MDA suite à l'exposition chronique du Méthidathion à raison de 5 mg/Kg de poids corporel.

Suite à la production accrue des espèces réactives de l'oxygène induite par le Méthidathion, l'organisme possède une multitude d'enzymes antioxydantes qui permettent de lutter contre les effets délétères du stress oxydatif. Une augmentation excessive des radicaux libres produit un déséquilibre du système prooxydant/antioxydant ce qui mène à une perturbation de l'activité de GPx, GST, SOD et CAT dans les organes étudiés des rats traités

par le Méthidathion comparativement aux rats témoins. Cette perturbation peut être expliquée soit par un état d'épuisement à la suite de surexploitation du stress oxydatif, soit tout simplement par une inhibition de leurs expressions par le Méthidathion.

La glutathion peroxydase (GPx) est une enzyme clé qui règle le niveau des ROS, la GPx est capable de non seulement de réduire le peroxyde d'hydrogène en eau, mais aussi les hydroperoxydes résultants de l'oxydation des acides gras insaturés. A la lumière des résultats du présent travail, on enregistre une diminution significative de l'activité de la GPx dans les organes étudiés (foie, reins, cerveau) chez les rats traités par le Méthidathion comparativement aux rats témoins. Cependant, l'activité de la GPx nécessite la présence du glutathion et du sélénium pour son bon fonctionnement (Nielson et Jorgensen, 1995), cette diminution est due principalement à une surproduction de peroxyde d'hydrogène et à un épuisement du sélénium et de GSH. Par contre, on enregistre une augmentation de l'activité de GPx dans les testicules, cela peut être expliqué par le fait que cet organe est le plus susceptible aux effets du Méthidathion.

La glutathion-S-transférase (GST) est une enzyme impliquée dans les processus de la détoxification plus particulièrement de la biotransformation de la phase II. En outre, en réponse au stress oxydant la fonction principale de la GST est de se conjuguer à une molécule de GSH et une grande variété de produits de la peroxydation lipidique pour permettre leur élimination (Manawadi et Kaliwal, 2010). Dans la présente étude, on observe une diminution significative de l'activité de la GST dans tous les organes étudiés. Ces résultats conforment avec ceux obtenus par Altuntas et al., (2002) qui ont constaté que le Méthidathion provoque des effets prooxydants sur l'activité enzymatique ce qui provoque leur inhibition.

La superoxyde dismutase (SOD) est une enzyme antioxydante qui prend en charge l'anion superoxyde et le métabolise en peroxyde d'hydrogène. Tandis que la catalase (CAT) est une enzyme péroxysomale dont le rôle est de prévenir les peroxydations des molécules biologiques induites par le peroxyde d'hydrogène précédemment produit par la SOD et le métabolise en eau.

On constate dans cette étude, une réduction significative de l'activité de la SOD dans le foie et les testicules, ainsi qu'une diminution significative de la CAT dans tous les organes étudiés chez les rats traités par le Méthidathion comparativement aux rats témoins. Cette diminution peut être attribuée à la surproduction de l'anion superoxyde. En outre, l'effet du Méthidathion sur la SOD est également attribué à la modification de l'expression de cette

enzyme en affectant sa structure, l'épuisement des antioxydants cellulaires comme le GSH et la vitamine E.

Des travaux élaborés par Kono et Fridovich, (1983) indiquent que l'inhibition de la catalase provoque la libération accru d' H_2O_2 , ce dernier peut à son tour inhibe l'activité de la superoxyde dismutase (SOD). En revanche, l'augmentation de l'activité de la SOD dans les reins et le cerveau reflète une activation du mécanisme compensateur vis-à-vis des effets délétères provoqué par le Méthidathion, ce qui indique une réponse adaptative aux radicaux libres générés (Akturk et al, 2001).

La thyroïde est une glande endocrine, responsable de la synthèse et la sécrétion des hormones thyroïdiennes (3,5,3'-triiodothyronine ou T3 et 3,5,3',5'-tetraiodothyronine ou T4). Ces hormones thyroïdiennes jouent un rôle très privilégiés dans la maturation et le développement de nombreux organes et tissu durant la période périnatale et participe à la maturation de l'homéostasie chez l'adulte. En plus, un rôle essentiel de ces hormones, est de favoriser la calorigénèse en augmentant la consommation de la synthèse de l'ATP ainsi que l'activité de la pompe Na^+K^+ ATPase (Degroot, 1989). De plus, les hormones thyroïdiennes possèdent deux principaux sites d'action ; au niveau nucléaire dont ils interviennent dans la régulation et la transcription des gènes ciblent, par contre au niveau mitochondriale, elles favorisent le découplage des phosphorylations oxydatives.

Des études toxicologiques montrent que suite à une exposition prolongé au fipronil favorise une hypersécrétion de l'hormone hypophysaire (TSH), en réponse à la diminution de la concentration circulante des hormones thyroïdiennes (T3, T4), ce qui pourrait entraîner un emballement du cycle cellulaire favorisant l'émergence de mutations spontanées potentiellement carcinogénèse (Criqui, 2006).

Dans la présente étude nous avons enregistré une diminution très hautement significative de la concentration en T3 et non significative de la concentration en T4. Cette diminution peut être attribuée aux effets délétères du Méthidathion sur les cellules folliculaires morphologiques, ou il inhibe l'action des enzymes responsables de la conversion de T4 en T3 (Ahmed et al., 2000). Par ailleurs, selon les travaux de (Silvestri et al., 2008), la concentration plasmatique du T3 est toujours inférieure à celle du T4, qui est peut être expliqué par la faible liaison de la T3 avec les protéines plasmatiques (TBG, TTR et albumine) et il se dégrade rapidement que la T4 dans le sang. Une étude similaire réalisée par Messarah et ces collaborateurs (2007) montrent l'installation d'un état de stress oxydant en relation avec l'hyperactivité thyroïdienne.

Nos résultats montrent également une diminution de la concentration sérique en testostérone, probablement liée à l'influence du Méthidathion sur la biosynthèse des androgènes suite à une inhibition de la 17-cétostéroïde réductase qui convertit l'androstènedione en testostérone. Cette diminution peut être expliquée par la destruction des cellules interstitielles de Leydig, responsable de la biosynthèse de la testostérone par les radicaux libres. Cependant, la testostérone est produite à partir du cholestérol, cette perturbation peut être corrélée à la diminution de la concentration plasmatique en cholestérol.

De nombreuses études ont recherché une éventuelle association entre l'exposition à certains pesticides et leurs effets sur la reproduction masculine. Selon l'étude de Taylor et al., (1978) qui montrent que l'exposition chronique de chlorodécone provoque une baisse significative du nombre de spermatozoïdes ainsi que de leur mobilités. Une autre étude réalisée par Monosson et al., (1999) indiquent que le vinchlozoline, un fongicide très répandu possède deux métabolites qui ont des propriétés anti androgénique, influençant ainsi sur le taux de testostérone.

La neurotoxicité correspond généralement à une perturbation de l'influx nerveux, le cas de l'acétylcholinestérase (AChE), enzyme impliqué dans la transmission de l'influx nerveux son inhibition traduit l'exposition à une ou plusieurs substances ayant une action neurotoxique. Les résultats obtenus indiquent une diminution significative de l'activité de l'AChE dans le cerveau chez les rats traité par le méthidathion comparativement aux rats témoins. Cette diminution est expliquée par l'effet inhibiteur irréversible du Méthidathion sur l'AChE.

Nos résultats sont en accord avec ceux de Karanth et al., (2004) qui rapportent que le chlorpyrifos et le méthyle parathion inhibent significativement après l'exposition, l'activité de l'AChE au niveau des cerveaux de rats adultes. La diminution d'AChE, observée in vivo et dans des tranches de cerveau, inhibe ainsi la neurotransmission cholinergique. Ceci est accompagné par des perturbations neurophysiologiques.

Nos résultats sont en accord avec les travaux de (Sutcu et al., 2006). De même, les résultats de Khaled et al., (2002) montrent qu'une administration d'une dose de 50 mg/Kg de chlorpyrifos inhibe significativement l'activité de la cholinestérase cervicale et plasmatique à un taux similaire chez les rats femelles et leur fœtus.

II. Evaluation des effets cytoprotecteurs et antioxydants du sélénium et du zinc contre la cytotoxicité induite par le Méthidathion chez les rats wistar

Dans la première expérimentation, la co-administration du sélénium et du zinc avec le Méthidathion, chez les rats traités a amélioré la croissance pondérale et les poids relatifs des organes (foie, reins et testicules), elle a rétabli l'anémie hémolytique provoquée par le Méthidathion. Comme, elle a réduit les effets cytotoxiques de Méthidathion sur les paramètres biochimiques que ce soit sur le bilan hépatique (activité enzymatique des transaminases, phosphatase alcaline et lactate déshydrogénase, glucose et bilirubine), le bilan rénal (urée, créatinine), le bilan lipidique (cholestérol, triglycérides) ou sur le bilan thyroïdien (T3, T4) et sur la testostérone.

La co-administration (Se+ Zn+ MD) a entraîné également une amélioration importante dans les paramètres du stress oxydatif (taux du GSH et MDA, activités enzymatiques de GPx, GST, SOD et CAT) dans les organes étudiés (foie, reins et testicules).

Au regard des résultats obtenus, il ressort que la co-administration du sélénium et du zinc a partiellement atténué les altérations histologiques du foie provoqué par le Méthidathion. Des études expérimentales réalisées par Heikal et al., (2012) et Goel et al., (2005), ont démontré que l'administration du sélénium et du zinc chez les rats traités par le chlorpyriphos restaure également les paramètres du stress oxydatif et réduit les altérations histologique des hépatocytes.

Le sélénium est un oligo-élément constitutif de la sélénocystéine, un acide aminé indispensable pour assurer le bon fonctionnement des glutathion peroxydases (GPx) et des thiorédoxine réductases : deux enzymes précieuses pour protéger l'organisme contre l'oxydation par les radicaux libres (Schelgel, 2010 ; Nys, 2001)

Le zinc est un oligoélément, c'est un cofacteur de la SOD et participe dans la plupart des fonctions biologiques principalement la défense oxydative des membranes cellulaires, la défense immunitaire, la synthèse des protéines, des lipides et des glucides et la biosynthèse des acides nucléique, ainsi que le transport de CO₂. En outre, Le zinc est un cofacteur de la delta-5-réductase ; enzyme clé du métabolisme de la testostérone produisant la dihydrotestostérone, (Prasad, 1998 ; Field et al, 2002), c'est pour cette raison, le taux de la testostérone est amélioré dans la présente étude.

De même, le zinc joue un rôle essentiel dans la protection des cellules contre les dommages causés par les radicaux libres, car il stimule la synthèse intestinale de la

métallothionéine (MTs), cette dernière est une protéine de faible poids moléculaire et possède une exceptionnelle richesse en résidus de cystéine. Les MTs jouent un rôle dans l'homéostasie des métaux essentiels tels que le zinc et le cuivre, la détoxification des métaux lourds tels que le cadmium et la protection contre les différents stress physiques et chimiques (Goel et al., 2000 ; Achard-Joris, 2005).

Nos résultats pouvant être comparé avec les données de différents travaux réalisées dans le même contexte par Said et al., (2010), évaluant l'effet préventif synergique du sélénium et du zinc après une exposition chronique au cadmium chez le rat male. Le cadmium provoque des dommages oxydatifs au niveau des testicules, marqué par une diminution significative de l'activité enzymatique de la GPx, SOD et de la CAT. Tandis que la supplémentation de la combinaison sélénium + zinc a rétabli ces perturbations. En outre, d'après la littérature, le sélénium et le zinc ne peuvent pas être des antagonistes, car la distribution orbitale des électrons est différente dans ces deux éléments. Généralement, les oligoéléments avec une structure électronique similaire, sont considérés comme des antagonistes (Hurley et al, 1983)

Il a été démontré in vivo qu'il existe une interaction entre le sélénium et le zinc chez les rats femelles traités par le ^{75}Se et le ^{65}Zn , cette interaction provoque une rétention importante du sélénium et une augmentation de la concentration en zinc dans le cerveau, la rate, le sang, les poumons et le cœur. Cependant, l'excrétion urinaire et fécale représente un bon marqueur de cette interaction. En effet, en présence du zinc, le taux du sélénium urinaire est faible de même, en présence du sélénium, le taux du zinc fécal est faible (Chmielnicka et al., 1988).

Des expériences réalisées par Deepmala et al., (2011) ont montré l'effet protecteur et modulateur de la co-administration du sélénium et du zinc contre la toxicité induite par le diméthylmercure (neurotoxine plus puissant) administré par voie orale chez les rats suite à une exposition chronique de 12 semaine.

Des données bibliographiques (Ferencik et Ebringer, 2003 ; Yan et Chang 2012) ont également confirmé que le traitement avec le sélénium et le zinc comme antioxydant et antitumeur est associé à plusieurs effets immunomodulateurs, tels que l'amélioration de l'activité des cellules NK (naturel Killer), des lymphocytes T, des macrophages et des neutrophiles affectant la prolifération et la différenciation cellulaire et intervenant donc à la prévention du cancer et d'autres pathologies y compris le stress oxydatif et l'inflammation.

Une étude récente de Ibrahim et al., (2011), réalisée pour évaluer l'effet protecteur de la combinaison du sélénium et du zinc administré par voie orale sur l'effet toxique du benzène chez les rats male de la souche Wistar, a montré une diminution du taux de MDA, une augmentation du taux de la GSH ainsi que l'activité enzymatique de la GPx, GST, SOD et CAT et une réduction des anomalies histologiques provoqué par le benzène sur les hépatocytes.

L'ensemble de ces résultats montrent l'effet protecteur et synergique du sélénium et du zinc sur l'hépatotoxicité induite par le Méthidathion entraînant ainsi une augmentation de la disponibilité du glutathion (GSH) qui est l'un des antioxydants intrinsèques qui empêchent les dommages cellulaires. On peut suggérer que ces oligoéléments, participent directement à la structure moléculaire des hormones ou des enzymes, contribuant à leurs donner une forme spacial optimum pour être reconnue par leurs récepteur.

III. Evaluation de la capacité préventive de l'extrait aqueux d'*Artemisia campestris* sur les effets néfastes induits par le Méthidathion chez les rats Wistar

La deuxième expérimentation concerne l'étude des effets préventifs et antioxydants de l'extrait aqueux d'*Artemisia campestris* contre la cytotoxicité induite par le méthidathion.

A la lumière de nos résultats de la détermination quantitative en polyphénols, en flavonoïdes et en tanins, il apparaît que la plante constitue une source prometteuse en composés bioactives bénéfiques à la santé humaine, principalement l'activité antioxydante pour la prévention contre les maladies provoquées telles que l'athérosclérose (Omar, 2010).

Tout d'abord, les polyphénols sont estimés par plusieurs méthodes, comme la méthode de bleu de Prusse (Graham, 1992), mais la plus utilisée est celle de Folin-Ciocalteu. En présence des polyphénols, le complexe Folin-Ciocalteu change sa couleur du jaune au bleu, ce qui permet de mesurer l'intensité de la couleur à une longueur d'onde de 765 nm dont l'acide gallique est utilisé comme standard. Les résultats du dosage montrent que l'extrait aqueux d'AC est riche en polyphénols totaux de l'ordre de 49.6 ± 0.04 mg EAG/g de matière sèche.

Akrout et al, (2011) ont montré que les extraits organiques et aqueux d'*Artemisia campestris* de la Tunisie sont caractérisés par la présence de polyphénols totaux de l'ordre de 463.2 mg EAG/g et 311.5 mg EAG/g respectivement.

Nos résultats sont en accord avec ceux de Bakhchiche et Guerib (2014), qui ont montré que la partie aérienne d'*Artemisia campestris* d'Algérie possède un contenu en polyphénols de l'ordre de 18.73 mg EAG/g.

On constate que le profil polyphénolique d'AC peut varier selon plusieurs facteurs tels que, le climat, la saison (floraison), la température et le solvant d'extraction, en effet, une température élevée au moment d'une extraction organique ou aqueuse permet d'obtenir un rendement élevé en polyphénols.

La détermination quantitative des flavonoïdes s'effectue par la méthode de trichlorure d'aluminium, basée sur la formation d'un complexe flavonoïde-ion d'aluminium ayant une absorbance maximale à 430 nm dont la quercétine est utilisée comme standard. Le résultat du dosage des flavonoïdes est de 29.8 ± 0.03 mg QE/g. En revanche, la teneur en tanins réalisée selon la méthode de Julkunen-Tiitto (1985), semble légèrement inférieure à celle des flavonoïdes et des polyphénols, de l'ordre de 20.52 ± 0.1 mg CA/g dont la catéchine est utilisée comme standard.

Plusieurs études (Saoudi et al., 2010 ; Akrouf et al., 2011) se sont intéressées à la quantification des flavonoïdes dans les extraits aqueux et organiques d'*Artemisia campestris*, dont le contenu varie entre 24 mg QE/g et 131.89 mg QE/g de matière sèche. Cependant, quand l'extraction est réalisée avec une solution alcoolique à 50 %, la valeur estimée est de 56.31 QE/g.

L'activité antiradicalaire *in vitro* de l'extrait aqueux d'*Artemisia campestris* est évaluée par le test au DPPH et la technique de décoloration du radical cation ABTS. Le test au DPPH est utilisé pour le criblage des molécules douées d'activités antioxydantes présentes dans les extraits des végétaux (Yi et al., 2008). Les résultats de l'analyse par les deux tests sont exprimés par la valeur de l'IC50. Une solution standard d'acide ascorbique est utilisée pour vérifier les deux méthodes d'activité antioxydante.

En ce qui concerne le test à l'ABTS, l'activité est de 0.726 mg/ml, alors qu'elle est inférieure pour le test au DPPH de l'ordre de 0.313 mg/ml. On peut conclure que les valeurs trouvées par le radical DPPH sont les plus importantes que celles trouvées par le radical ABTS, par comparaison à celle de l'antioxydant standard acide ascorbique.

Nos résultats sont en accord avec les travaux de Akrouf et al., (2011) qui ont montré dans leurs travaux que la valeur du CI50 % au test de DPPH est inférieure pour les trois types d'extraits (Ethanol 50 %, huile essentielle et extrait aqueux) par rapport au test de l'ABTS.

A travers la recherche bibliographique, la détermination des coefficients de corrélation entre les CI50 et le contenu en polyphénols et en flavonoïdes a montré l'existence d'une corrélation négative ($R^2 = -1$). Ce qui signifie que les valeurs de CI50 diminuent avec l'augmentation du contenu de polyphénols et flavonoïdes (Mariod et al., 2010).

Certains travaux ont montré que l'activité antioxydante est corrélée positivement avec la structure des polyphénols. En effet, les polyphénols ayant un grand nombre de groupement hydroxyles (OH), présentent l'activité antioxydante la plus élevée due à leur pouvoir de donner plus d'atome pour stabiliser les radicaux libres (Hein et al., 2002 ; Torres de Pinedo et al., 2007).

Dans la présente étude, l'huile essentielle obtenue après hydrodistillation des feuilles sèches d'*Artemisia campestris* (Rendement : 0.9%) est analysée par la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/SM). Le résultat de cette analyse révèle que l'huile essentielle d'AC est en majorité constituée de monoterpène hydrocarbonés dont les plus importants sont (α -pinène 20 %, β -pinène 1.9 %, Myrcène 8.3%, *p*-cymène 6.3 %, Limonène 6.5 %, (*Z*)- β -ocimène 6.8 %, (*E*)- β -ocimène 3.6 % et γ -terpinène 3%). Ce qui

explique l'activité antitumorale de la plante vis-à-vis de différents types de cancers (cerveau, foie et la peau) (Li et al, 2009 ; Darmanin et al, 2009).

En 2011, Akrouf et ses collaborateurs, ont conclu que l'huile essentielle d'*Artemisia campestris* est constituée en majeure partie de monoterpènes hydrocarbonés (72.2 %) suivi par les sesquiterpènes hydrocarbonés (15.0 %) et les monoterpènes et sesquiterpènes oxygénés de l'ordre de 2.9 et 8.9 % respectivement.

D'après la littérature, cette plante est utilisée en médecine traditionnelle et elle possède plusieurs propriétés antioxydantes et antiradicalaires (antibactérien, antifongique, perturbation gastrique, diarrhée, crampes abdominales, hypertension, rhumatisme, envenimation...). (Boukef , 1986). Selon Aniya et al. (2000), un extrait aqueux d'*Artemisia campestris* a montré une forte activité antiradicalaire et antioxydante (test DPPH, test superoxyde). De nombreuses études expérimentale in vitro et in vivo ont montré que l'*Artemisia campestris* exercer une activité antioxydante. En effet, Sefi et al., (2011) ont testé l'effet préventeur de 5 % de l'extrait aqueux d'*Artemisia campestris* sur les dommages oxydatifs induits au niveau du foie, après une exposition chronique au fenthion à une dose de 551 ppm chez les rats adultes pendant 21 jours de traitement.

Plusieurs études ont montrés que les composés flavonoïdes et polyphénols inhibent la formation des radicaux libre ainsi que la propagation des réactions oxydative à travers des réaction de don de l'hydrogène et hydroxylation aromatique (Hanasaki et al., 1994).

Saoudi et al., (2008) ont montré que l'exposition aiguë des rats aux extraits de chair et de foie de *L. lagocephalus* a induit une néphrotoxicité et des effets cytotoxiques oxydatifs. Ainsi l'extrait d'*Artemisia* semble jouer un rôle rénoprotecteur contre la toxicité induite par l'extrait de toxine de *L. lagocephalus* en atténuant les dommages oxydants grâce à ses propriétés antioxydantes.

De plus, les travaux de Séfi et al, 2010 suggèrent que l'administration de l'extrait aqueux d'*Artemisia campestris* à une dose de 200 mg/Kg chez les rats diabétique, induit une augmentation de la biosynthèse de la glutathion (GSH), diminuant ainsi le stress oxydatif.

D'après les résultats obtenus dans la deuxième expérimentation, on peut constater que le prétraitement et la co-administration d'extrait aqueux d'*Artemisia campestris* avec le Méthidathion ont fourni une protection significative aux paramètres hématologiques et biochimiques, et aux marqueurs du stress oxydatif qui sont altérés en présence de cet insecticide (Méthidathion). Cela est probablement dû à la richesse de l'extrait en composés

bénéfiques qui ont un pouvoir antioxydant puissant et jouent certainement un rôle important *in vivo*.

A l'égard de ce désordre biochimique sérique, on constate que le MD induit un effet oxydatif hépatique, rénal et nerveux après une exposition. Ceci est justifié par l'installation d'une peroxydation lipidique dans les organes en question et ce phénomène toxique engendre aussi une diminution significative des activités SOD, CAT et GPx. Des résultats similaires ont mentionné le même désordre enzymatique des activités antioxydantes SOD, CAT et GSH-Px (Xu et al., 2007). La co-administration de l'extrait d'artémisia semble atténuer la toxicité induite par le MD et rétablit le taux des TBARS et des enzymes antioxydantes SOD, CAT et GPx vers la normale.

En effet, la supplémentation de l'extrait aqueux d'AC allégeait aussi les altérations histologiques (foie et reins) induites par le Méthidathion. Cette amélioration pourrait être attribuée à la richesse de cette plante en composés phénoliques conduisant à la réduction des modifications histopathologiques et la restauration de l'état physiologique normal de l'organisme.

Des travaux antérieurs effectués sur des cellules nerveuses ont prouvé que l'addition des extraits de certaines plantes médicinales à savoir : *Euphorbia hirata*, *Piper methysticum*, *Scaevola sericea* à la dose de 5g/l protège contre la toxicité induite par l'ouabaine, la vératridine et la ciguatoxine. Ces résultats prouvent que ces extraits végétaux contiennent des composés actifs antioxydants qui empêchent la cytotoxicité évoquée par ces biotoxines (Boydron-Le Garrec et al., 2005). Nos études corroborent aussi avec les travaux de Hayder et al. (2008) qui montrent que les feuilles de *Myrtus communis* ont des activités antioxydantes qui empêchent l'activation de la xanthine oxydase, la production des LPO et agissent comme piègeur de radicaux libres (radical DPPH).



CONCLUSION

Conclusion et perspective

Au terme de cette étude de recherche, nos résultats montrent, dans un premier temps, que l'administration du Méthidathion, que ce soit dans la première et/ou dans la deuxième expérimentation à 5 mg/kg de poids corporel par gavage chez les rats mâles adultes pendant 28 jours, a provoqué des perturbations dans la plupart des paramètres étudiés. L'ensemble des résultats obtenus nous ont permis de tirer les conclusions suivantes:

- En ce qui concerne la croissance corporelle, nos résultats ont indiqué :
 - Une diminution du poids corporel durant la période de traitement accompagnée d'une augmentation des poids relatifs des organes étudiés (foie, reins, testicules et cerveau).
- À propos de l'étude des paramètres hématologiques, l'administration du Méthidathion a provoqué :
 - Une diminution du nombre de globules rouges, d'hémoglobine et d'hématocrite par rapport aux valeurs moyennes. Témoinnant de l'installation d'une anémie de type hémolytique.
- Le traitement par le Méthidathion a induit des perturbations au niveau des paramètres biochimiques et des biomarqueurs hépatiques, rénaux, thyroïdiens et métaboliques, ce qui confirme l'effet hépatotoxique et néphrotoxique du Méthidathion :
 - hyperglycémie ;
 - diminution de la concentration plasmatique en bilirubine totale ;
 - diminution de la concentration plasmatique en cholestérol ;
 - augmentation du taux des triglycérides ;
 - augmentation de la concentration en urée et en créatinine ;
 - augmentation de l'activité enzymatique ASAT, ALAT, PAL, LDH ;
 - diminution de la concentration plasmatique en T3 et T4, et en testostérone.
- En ce qui concerne l'étude des paramètres du stress oxydatif sur les organes étudiés (foie, reins, testicule et cerveau), nos résultats ont montré aussi que le Méthidathion a un effet pro-oxydant, capable de perturber le système antioxydant par :

- une diminution du taux de glutathion réduit (GSH) dans tous les organes étudiés;
 - une forte peroxydation lipidique (MDA) au niveau de tous les organes étudiés;
 - une diminution de l'activité enzymatique de la glutathion peroxydase (GPx) au niveau du foie, des reins et du cerveau;
 - une diminution de l'activité enzymatique de la glutathion-S-transférase au niveau de tous les organes étudiés;
 - une diminution de l'activité enzymatique du superoxyde dismutase (SOD) au niveau du foie;
 - une diminution de l'activité enzymatique de la catalase (CAT) au niveau de tous les organes étudiés;
 - une diminution de l'activité enzymatique de l'acétylcholinestérase (AChE) au niveau du cerveau.
- En ce qui concerne l'étude histologique, nos résultats illustrent des atteintes remarquables au niveau des organes étudiés (foie, reins). Ceci témoigne de l'effet cytotoxique du Méthidathion et ses métabolites exercés sur ces deux organes cibles les plus susceptibles d'être endommagés.
- En outre, nos résultats montrent également que la supplémentation du sélénium à raison de (1.5 mg/kg de poids corporel) et le zinc (0.227 mg/ml) ou le prétraitement par l'extrait aqueux d'*Artemisia campestris* à raison de (5 g/l) avec le Méthidathion ont amélioré la plupart des paramètres étudiés :
- une amélioration des paramètres physiologiques ;
 - une diminution du taux plasmatique en urée et en créatinine;
 - une diminution du taux des biomarqueurs de toxicité à savoir : ASAT, ALAT, PAL, LDH ;
 - une augmentation du taux de GSH ;
 - une diminution significative du taux de MDA;
 - une régulation de l'activité des enzymes antioxydantes (GPx, GST, SOD et CAT) ;
 - une régulation du taux sérique en hormones thyroïdiennes et en testostérone;

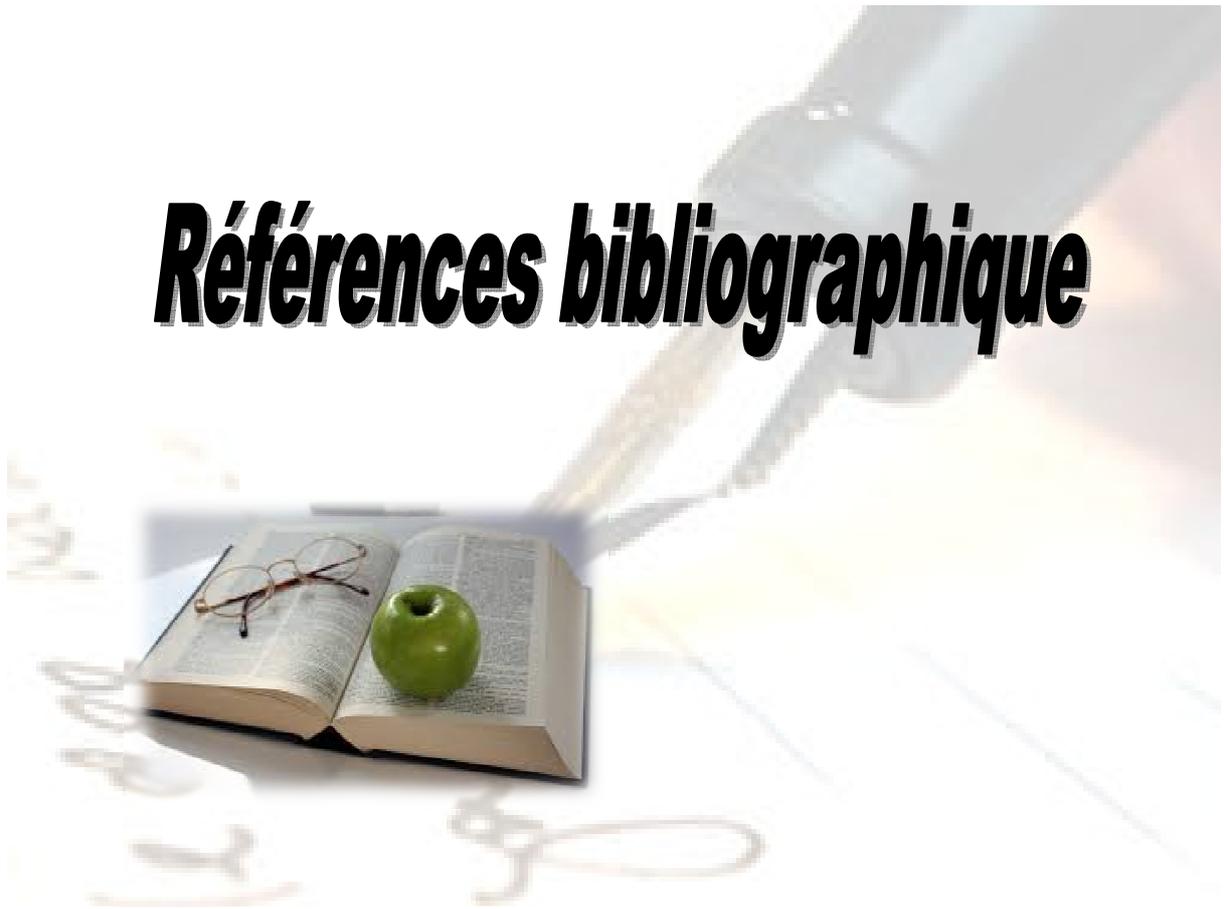
CONCLUSION ET PERSPECTIVE

- une augmentation de l'activité enzymatique de l'AChE au niveau du cerveau ;
- une réduction des effets cytotoxiques du Méthidathion sur l'histoarchitecture du parenchyme hépatique et rénale.

En perspective, il sera intéressant :

- ✚ d'explorer les métallothionéines ainsi que les protéines du stress : Heat Shock Proteins (HSP) ;
- ✚ d'extraire et de déterminer toutes les molécules bioactives de l'*Artemisia campestris* pour mieux caractériser ses effets protecteurs vis-à-vis du stress oxydatif.

Références bibliographique



A

Abdur, R., Huang, Z. (2015). Selenium-Functionalized Molecules (SeFMs) as Potential drugs and nutritional supplements. *Top.Med.Chem.* 87: 119-153.

Adam, C., Roussel-Debat, S. (2002). Fiche radionucléide et environnement : Sélénium 79. Ed. IRNS. France. Paris. pp : 1-27.

Achard-Joris, M., Van den, B., Van Saparoea, H.B., Driessen, A.J., Bourdineaud, J.P. (2005). Heterologously expressed bacterial and human multidrug resistance proteins confer cadmium resistance to *Escherichia coli*. *Biochemistry.* 19; 44(15):5916-22.

Aebi, H. (1984). Catalase, In: Bergmeyer, H.U. *Methods of Enzymatic Analysis*, 2^{ème} Ed. Academic press. New York. pp: 673-884.

Ahmed, M.M., Sahar, L., Nasit, F., Minhas, R. (2000). Pesticides induce changes in Secretory Activity of the thyroid gland in rats. *Pakistan J. Zool.* 32, 333-336.

Akrout, A., Chemli, R., Chreif, I., Hammami, M. (2001). Analysis of the essential oil of *Artemisia campestris* L. *Flavour and Fragrance Journal.* 16 (5): 337-339.

Akturk, A., Yıldız, K.D., Bilen, N., Bayramgürler, D., Kıran, R., Onyedi, M. (2006). Skin cancer cases admitted to Kocaeli University Medical Faculty between years 1996 and 2003. *Clinics of Turkey J. Dermatol.* 16, 44-49.

Akrout, A., Gonzalez, L.A., El-Jani, H.J., Madrid, P.C. (2011). Antioxidant and antitumor activities of *Artemisia campestris* and *Thymelaehirsuta* from southern of Tunisia. *Food. Chem. Tox.* 49, 342-347.

Akrout, A., Neffati, M., Chemli, R., Aouni, M., Jerraya, R., Dammak, M., Dar, A. (2007). Composition chimique et activités biologiques de l'huile essentielle d'*Artemisia campestris* L. *Revue des régions arides. Acte du séminaire international « les plante à parfum aromatique et médicinales ».* SIPAM. Djerba-Tunisie, 2-4/11/2006. pp : 231-240.

Allsop, M., Tirado, R., Johnston, P., Santillo, D., Lemmens, P. (2015). Santé: les pesticides sèment le trouble. Laboratoires de recherches de Greenpeace. United Kingdom. pp : 3-54.

Al-Sanafi, A.E. (2015). The pharmacological importance of *Artemisia campestris*-A review. *Asian J. Pharm. Res.* Vol. 5 (2):88-92.

- Altuntas, I., Delibas N., Demirci M., Tamer., N.** (2002). The effects of Methidathion on lipid peroxidation and some liver enzymes: role of vitamins E and C. *Archives of Toxicology*. 76, 470-73.
- Aniya, Y., Shimabukuro, M., Shimoji, M., Kohatsu, M., Gyamfi, M.A., Miyagi, C., Kunii, D., Takayama, F., Egashira, T.**(2000). Antioxidant and hepatoprotective actions of the medicinal herb *Artemisia campestris* from the Okinawa Islands. *Biol. Pharm. Bull.* 23(3):309-12.
- Apfelbaum, M., Perlmutter, L., Nillus, P., Forrat, C., Begon, M.** (1981). *Dictionnaire pratique de diététique et de nutrition*. Ed. Masson. Paris. pp : 710-719.
- Asada, K., Takahashi, M., Nagate, M.** (1974) Assay and inhibitors of spinach superoxide dismutase. *Agric. BioI. Chern.* 38, 471-473.
- Asmaa, N., Boubakeur, S., Boulanouar, B., Maatallah, M.** (2015). Etude comparative des indices d'activité antioxydante des extraits du Cérium et du DPPH: Application sur trois plantes médicinales locales. *International Journal of Innovation and Applied Studies*.13 (3), pp. 681-690.
- Astiz, M., De Alaniz, M.J., Marra, C.A.** (2012). The oxidative damage and inflammation caused by pesticides are reverted by lipoic acid in rat brain. *Neurochem. Int.* 61(7): 1231-1241.
- Attia, A.A., Elmazoudy, R., Elshenawy, N.S.** (2012). Antioxidant role of propolis extract against oxidative damage of testicular tissue induced by insecticide chlorpyrifos in rats. *Pest Biochem. Physiol.* 103(2):87–93.
- Audigié, C.L., Zonszain, F.** (1995). *Biochimie métabolique (bioscience et technique)*. Nouvelle Ed. Doin. Paris. pp: 118-119.
- Aurousseau, B.** (2002). Les radicaux libres dans l'organisme des animaux d'élevage : conséquences sur la reproduction, la physiologie et la qualité de leurs produits. *INRA. Prod. Anim.* 15 (1), 67-82.

B

- Bakchiche, B., Gherib, A., Maatallah, M., Miguel, M.G.** (2014). Chemical composition of essential oils of *Artemisia campestris* and *Juniperus phoenicea* from Algeria. *Inter. J. Inno. Appl. Studies*. 9 (4): 1434-1436.
- Barceloux, D.G.H.** (1999). Sélénium. *Clini. Toxicol.* 37 (2): 145-172.

- Barouki, R. (2006).** Stress oxydant et vieillissement. Ed. *Medicine/science*. **22**: 266-272.
- Baud, F., Kayouka, M., Houz , P. (2009).** Mise au point sur le traitement des intoxications par les insecticides organophosphorés. *Urgences FMU.47* : 489-496.
- Baudler , S., Baumgartl, J., Hampel, B., Buch, T., Waisman, A., Snapper, C.M., Krone, W. (2005).** Insulin-like growth factor-1 controls type 2 T cell-independent B cell response. *J Immunol.* 1;174 (9) :5516-25.
- Beauchamp, C., Fridovich, I. (1971).** Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable 580 to acryl amide gels, *Ana. Bioch.* 44, 276-287.
- B dry, R., Uanas, B., Danel, V., Fayon, M. (2002).** Guide pratique de toxicologie p diatrique. Ed. Arnette groupe liaisons (SA). Cedex. France, pp : 122-125.
- Ben Amara, I., Soudani, N., Troudi, A., Bouaziz, H., Boudawara, T., Zeghal, N. (2010).** Antioxidant effect of vitamin E and selenium on hepatotoxicity induced by dimethoate in female adult rats. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 74:811-819.
- Ben Amara, I., Soudani, N., Troudi, A., Bouaziz, H., Boudawara, T., Zeghal, N. (2011).** Antioxidant effect of vitamin E and selenium on hepatotoxicity induced by dimethoate in female adult rats. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 74, 811-819.
- Bengra, A. (2014).** M moire de fin d'étude en médecine ; Aggrodermatite enteropathique.. Université Abou Bekr Belkaid. Tlemcen. Algerie. pp : 12-15.
- Ben Sassi, A., Harzallah-Skhiri, F., Aouni, M. (2007).** Investigation of some medicinal plants from Tunisia for antimicrobial activities. *J.Pharmaco.Bio.* 45 (5): 421–428.
- Biland i , N., Sedak, M., Đoki , M., Varenina, I., Kolanovi , B.S., Bo i , D., Brstilo, M., Œimi , B. (2014).** Determination of zinc concentrations in foods of animal origin, fish and shellfish from Croatia and assessment of their contribution to dietary intake. *Journal of Food Composition and Analysis.* 35 (2): 61–66.
- Blois, M.S. (1958).** Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature.* 29, 1199- 1200.
- Bloomquist, J.R. (1996).** Insecticides: chemistries and characteristics. In: E. B. Radcliffe and W. D. Hutchison [eds.], *Radcliffe's IPM World Text book*. University of Minnesota, St. Paul, MN.
- Bocquen , G., Galgani, F., (1998).** Cholinesterase inhibition by organophosphorous and carbamate compounds. *Techniques in Marine Environmental Science.* 22, 1-12
- Boltz, P., Harry, P., Garnier, R., Nisse, P. (2008).** Rapport d'exposition aux spécialités phytopharmaceutiques contenant du Méthidathion. France, pp : 30-34

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Bonnard, N., Brondeau, M.T., Pillière, F., Protois, J.C., Schneider, O. Serre, P. (2002).** Sélénium et composés. Cahier de note documentaire. Hygiène et sécurité de travail, 186. (Fiche INRS6+-FT n°150)
- Bonnard, N., Brondeau, M.T., Jargot, D., Pillière F., Shneider, O., Serre, P. (2011).** Fiche toxicologique de sélénium et composé. Institut national de recherche et de sécurité.
- Borg, J., Reeber, A. (2008).** Les cours du PCEM biochimie métabolique, 2^{ème} Ed. Ellipses, Cedex. Paris : 217-233, 257-274.
- Bougandoura, N., Bendimerad, N. (2013).** Evaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux et méthanolique de *Satureja calaminthassp.Nepeta* (L.). Briq. Rev. Nature Et Technologie. 9, 14-19.
- Boukef, M.K (1986).** Les plantes dans la médecine traditionnelle tunisienne. Agence de coopération culturelle et technique. Paris
- Bourgaud, F. (2013).** Les questions et travaux de recherche nécessaires au développement de la filière : exemple de l'apport des sciences cognitives à la production/valorisation des métabolites secondaires d'intérêt. Plantes à parfum aromatique et médicinales. Univ. Lorraine. INRA. Nancy-Colmar.
- Boydron-Le garrec, R., Benoit, E., Sauviat, M.P., Lewis, R.J., Molgo, J., Laurent, D. (2005).** Ability of some plant extracts, traditionally used to treat ciguatera fish poisoning, to prevent the in vitro neurotoxicity produced by sodium channel activators. Toxicon. 46, 625-634.
- Bradford, M.A. (1976).** Rapid and sensitive method for the quantities of microgram quantities of protein utilizing the principal of protein binding. Ana. Bioch. 72, 248-254.
- Brown, J.E., Khodr, H., Hider, R.C., Rice-Evans, C. (1998).** Structural dependence of flavonoid interactions with Cu²⁺ ions: implications for their antioxidant properties. Biochem. J. 330, 1173-1178.
- Bruneton, J. (1993).** Pharmacognosie, phytochimie des plantes médicinales. 2^{ème} Ed. Tec et Doc. Paris, pp ; 914
- Buege, J.A., Aust, S.D.(1984).** Microsomal lipid peroxidation. Methods enzymol.105, 302-310.
- Bruneton, J. (1999).** Pharmacognosie, Phytochimie-Plantes médicinales. 3^{ème} Ed. Techniques et documentations. Paris. pp: 227-310-312-313-314.494.
- Buccolo, G., Harold, D. (1973).** Quantitative determination of serum triglycerides by use of enzymes. Clini. Chem.19(5): 476-482.

Buege, J.A., Aust, S.D. (1984) Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 105, 302-310.

Buhrer-Astfalk, E.(2011). Le zinc et l'importance des produits laitiers. Ed. Swiss Milk.

Burk, R.F., Hill, K.E. 1994. Selenoprotein P. A selenium-rich extracellular glycoprotein-/
Nutr. 124:1891-1897.

C

Camara, C.M., Djessou, P., Mondé, A.A., Lohoues, E.C., Djohan, Y.F., Aka, A., Sess, E.D. (2006). Evaluation des marqueurs du stress oxydant dans une population de Hanseniens en cote d'Ivoire. *Rev. Science et Médecine. Cames.* 4: 40-43.

Campbell, P.N., Smith, A.D.(2006). *Biochimie illustré.* Ed. Malloine. Paris. pp:234-311.

Caratini, R. (1971). *Bordas encyclopedie.* Ed Bodas.Belgique.23: 137-195

Cemek, M., Büyükben, A., Büyükkuroğlu, M.E., Aymelek, F., Tür, L. (2010). Protective roles of vitamin E (α -tocopherol), selenium and vitamin E plus selenium in organophosphate toxicity in vivo: A comparative study. *Pest. Bioch. Physio.* 96, 113-118.

Chappuis, P. (1991). *Les oligo-éléments en médecine et biologie.* Ed. Lavoisier. Paris.

Chassard-Bouchaud, C. (1995). *l'écotoxicologie.* Ed. P.u.d. France. Paris.

Chen, H.Y., Lin, Y.C., Hsieh, C.L. (2007). Evaluation of antioxidant activity of aqueous extract of some selected nutraceutical herbs. *Food Chemistry.*104, 1418-1424.

Chmielnicka, J., Zareba, G., Witasik, M., Brzeźnicka, E. (1988). Zinc-selenium interaction in the rat. *Biol. Trace. Elem. Res.* 15, 267-276.

Chopade, H.M., Dauterman, W.C. (1981). Studies of the in vitro metabolism of Methidathion by rat and Mouse liver. *Pest. Bioch. Physio.* 15, 105-119.

Cillard, J., Cillard, P. (2006). Mécanisme de la peroxydation lipidique et des antioxydants. *O.C.L.* 1 (13) : 24-29.

Collard, J.(2010). *Les systèmes de défense antioxydants.* Labo-Link, Synlab Belgique.

Collard, J.(2014). *Les marqueurs biologiques du stress oxydant,* Synlab Belgique.

Collard, J.(2014b). *Stress oxydant-Généralité.* Labo-Link, Synlab Belgique.

Corrine, A.(2010). *Stress oxydatif, calcium et thermalisme.* Société française d'hydrologie et climatologie médical. 147 (2) : 121-138.

Criqui, A.J.A. (2006). *Thèse de doctorat Influence de la liaison des hormones thyroïdiennes aux protéines plasmatiques sur l'homéostasie de la fonction.* Toulouse 3.

D

- Dacosta, Y.** (2003). Les phytonutriments bioactifs. Ed. Yves Dacosta. Paris, pp 317 (cited in Djemai Zoueglache, S., 2008).
- Dadoune, J.P.** (2000). Histologie : de la biologie à la clinique. 2^{ème} Ed Médecine-Sciences-Flammarion, pp : 193-201.
- Dale, A., Dickinson, L., Shelly, C., Forman, H.J.** (2006). Glutathione-Synthesis: The Virtual Free Radical. School SFRBM Education Program.
- Dal-Pizzol, F., Klamt, F., Bernard, R.J.S., Moreira, J.C.F.** (2001). Mitogenic signalling mediated by oxidants in retinal treated Sertoli cells, Free Radical Research, 35, , 749–755.
- Damianaki, A., Bakogeorgou, E., Kampa, M., Notas, G., Hatzoglou, A., Panagiotou, S., Gemetzi, C., Kouroumalis, E., Martin, P.M., Castanas, E.** (2000). J. Cell. Biochem. Potent inhibitory action of red wine polyphenols on human breast cancer cells 78, 429–44.
- Damintoti, K., Dicko, M.H., Simphoré, J., Yameogo, S., Sanon, S., Traoré, A.S.** (2005). Activité antioxydantes et antibacteriennes des polyphénols extraits de plantes médicinales de la pharmacopée traditionnelle du Burkina Faso. Acte du séminaire international..Ouagadougou, 8/11/2005.
- Darmanin, S., Wismayer, P.S., Camilleri Podesta, M.T., Buhagiar, J.A.** (2009). An extract from *Ricinus communis* L. leaves possesses cytotoxic properties and induces apoptosis in SK-MEL-28 human melanoma cells. Nat. Prod. Res. 23(6), 561–571.
- Deepmala, J., Deepak Kumar, M., Sadhana, S., Ajai Kumar, S.** (2011). Combined Effect of N-Acetyl Cysteine, Zinc, and Selenium Against Chronic Dimethylmercury-Induced Oxidative Stress: A Biochemical and Histopathological Approach. Arch. Environ. Contamin. Toxicol. 61(4): 558-67.
- Defraigne, J.O., Pincemail, J.** (2007). Stress oxydant et antioxydants : Mythes et réalités. Rev. Med. Liège. 62 (4) : 1-10.
- Degroot, L.J.** (1989). Mechanisms of action of thyroid hormone. In: Endocrinology USA: W.B. Saunders Company, 2^{ème} Ed. 1, 563-571.
- Delattre, J., Durand, J., Jardillier, J.C.** (2003). De la biologie a la Clinique pathologique: aspect moléculaire et cellulaire. Ed. Médecine Science Flammarion. Paris. pp : 51-81.
- Delattre, J., Théron, P., Bonnefont-Rousselot, D.** (2005). Espèces réactives de l’oxygène, antioxydants et vieillissement. In : Delattre, J., Beaudoux, J.L., Bonnefont-Rousselot, D.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Radicaux libres et stress oxydant : aspects biologiques et pathologiques. Lavoisier édition TEC & DOC éditions médicales internationales. Paris. pp : 281-351.
- Dellile, L.A. (2010). **Les plantes médicinales d'Algérie. 2^{ème} Ed : 106-114-200.**
- De Pascual, J.T., Gonzalez, M.S., Muriel, M.R, Bellid I.S.** (1984). Phenolic derivatives from *Artemisia campestris* Subsp *Glutinosa*. *Phytochemistry*. 23 (8): 1819-1821.
- Descotes, J., Testud, F., Frantz, P.** (1992). *Les urgences en toxicologie*. Ed. Maloine. Paris. pp : 112-128.
- Desmots, F., Rissel, M., Loyer, P., Turlin, B., Guillouzo, A.** (2001). Immunohistological analysis of glutathione transferase A4 distribution in several human tissues using a specific polyclonal antibody. *J. Histochem. Cytochem.* 49(12): 1573-1580.
- Dickinson, D.A., Forman, HJ.**(2002). Cellular glutathione and thiols metabolism. *Biochem. Pharmacol.* 64: 1019-1026.
- Ding, Y., Yao, H., Yao, Y., Yenwong, F.L., Zhang, Z.** (2013). Protection of dietary polyphenols against oral cancer nutrients. 5 (6): 2173-2191.
- Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P., Vidal, N.**(2006). Antioxidant activity of some Algerians medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry*. 97, 654-660.
- Dodig, S., Cepelek, I.** (2004). The facts and controversies about selenium. *Acta. Pharm.* 54; 261-276.
- Dohou, N., Yamni, K., Tahrouche S., Idrissi Hassani, L.M., Badoc., A., Gmira, N.** (2003). screening phytochimique d'une endémique ibéro-marocaine, *THYMELAEA LYTHROIDES*. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 142, 61-78
- Droge, W.** (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* 82 (1): 47-95.
- Duchemin, J.** (2006). Exposition humaine aux produits phytosanitaires et risque pour la santé humaine, note AESN.
- Ducros, V., Favier, A.** (2004). Selenium metabolism. *EMC-endocrinologie*. 1, 19-28.
- Dumas, C.A.** (2003). Cours de phytothérapie (I et II): École d'enseignement supérieur de naturopathie. Montréal. Québec.
- Duvoid, I.**(1999). Le Sélénium, un élément essentiel parfois redoutable ou le rapport bénéfique/risque du sélénium. DESS en Informatique Documentaire. Rapport de recherche bibliographique. Université Claude Bernard Lyon 1.

E

El-Demerdash, F.M. (2004). Antioxidant effect of vitamin E and selenium on lipid peroxidation, enzyme activities and biochemical parameters in rats exposed to aluminium. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 18, 113-121.

El-Demerdash, F.M. (2011). Lipid peroxidation, oxidative stress and acetylcholinesterase in rat brain exposed to organophosphate and pyrethroid insecticides. *Food and Chemical Toxicology*. 49(6): 1346-1352.

Ellman, G.L.(1959). Tissue sulphhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 82, 70-77.

Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V., Featherstone, R.M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol*. 7, 88-95.

Etemad, B., Kuijt, T.E.F., Kops, G.J. P. L. (2015). Kinetochores–microtubule attachment is sufficient to satisfy the human spindle assembly checkpoint. *Nat. Commun*. 6, 8987.

F

FAO/WHO.(1995). Recommendations for the revision of the guidelines for predicting dietary intake of pesticide residues. Report of a FAO/WHO Consultation, 2-6 May 1995, York, United Kingdom, WHO/FNU/FOS/95.11, WHO, Geneva.

Favier, A. (2003). Le stress oxydant, intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes de maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*. Grenoble. pp: 108-115.

Fawcett J K., Scott, J.E. (1960). A rapid and a precise method for the determination of urea. *J Clin.Path*. 13, 156-169.

Ferencik, M., Ebringer, L. (2003). Modulatory effects of selenium and zinc on the immune system. *Folia Microbiol (Praha)*. 48 (3): 417-426.

Field, C.J., Johnson, J.R., Schley, P.D. (2002). Nutrients and their role in host resistance to infection. *J. Leuko. Biol*. 71 (1): 16-32.

Flohe, L., Gunzler, W.A. (1984). Analysis of glutathione peroxidases. *Methods in Enzymology*. 105, 114-121.

Fossati, P., Prencipe, L. (1982). Serum triglycerides determined colorimetrically with an enzyme that produces hydrogen peroxide. *Clin. Chem.* 28, 2077-2080.

Fontaine, E., Barnoud, D., Schwebel, C., Lerverve X. (2002). Place des antioxydants dans la nutrition du patient septique. Edition scientifique et médicale Elsevier SAS. 11, 411-20.

Fournier, E. (1993). Toxicologie : Biologie cellulaire appliqué à la sécurité des produits chimiques. Ed. Ellipses. Paris, pp : 64-81.

Frausto-da-saliva, J.J.R., Williams, R.J.P. (1991). The biological chemistry of elements: the inorganic chemistry of life, Clarendon press, Oxford, U.K, pp: 206.

French, J.K., Winterbourn, C.C., Carrel, R.W. (1978). Mechanism of oxyhaemoglobin breakdown on reaction with acetyl phenyl hydrazine. *Bioch. J.* 17, 19–26.

G

Ghestem, A., Seguin, E., Paris, M., Orecchioni, A.M. (2001). Le préparateur en pharmacie 2^{ème} Ed. TEC et DOC. Paris. pp: 275. (cited in Djemai Zoueglache S, 2008).

Ghorab, H., Laggoune, S., Kabouche, A., Semra, Z., Kabouche Z. (2013). Essential oil composition and antibacterial activity of *Artemisia campestris* L. from Khenchela (Algeria). *Scholar research library. Der Pharmacia Lettre.* 5 (2): 189-192.

Goel, A., Chanuhan, D.P., Dhawan, D.K. (2000). Protective effects of zinc in chlorpyrifos induced hepatotoxicity; a biochemical and trace element study. *Bio.Trace. Element. Res.* 74, 171–183.

Goel, A., Dani, V., Dhawan, D.K. (2005). Protective effects of zinc on lipid peroxidation, antioxidant enzymes and hepatic histoarchitecture in chlorpyrifos-induced toxicity. *Chem. Biol. Interact.* 156, 131-140.

Gokalp, O., Gulle, K., Sulak, O., Cicek, E., Altuntas, I. (2003). The effects of methidathion on liver: role of vitamins E and C. *Toxicol. Ind. Health.* 19, 63-67.

Gonzalez-Trujano, M.E., Pena, E.I., Martinez, A.L., Moreno, J., Guevara-Fefer, P., Deciga Campos, M., Lopez-Munoz, F.J. (2007) Evaluation of the antinociceptive effect of *Rosmarinus officinalis* L. using three different experimental models in rodents. *J Ethnopharmacol.* 111, 476-482.

Graham, H.D. (1992). Stabilisation of the Prussian blue colour in the determination of polyphenols. *J. Agric. Food. Chem.* 40, 801-805.

Guignard, J. L., Cosson, L., Henry, M. (1985). Abrégé de phyto-chimie. Masson, Paris, pp 175-191.

Gultekin, S.H., Rosenfeld, M.R., Voltz, R. (2000). Paraneoplastic limbic encephalitis, neurological symptoms, immunological findings and tumour association in a 50 patients. *Brain*. 123, 1481-1494.

Gupta, R.C., Patterson, G.T., Dettbarn, V.D.(1991). Comparaison of cholinergic and neuromuscular toxicity following acute exposure to sarin and VX in rat. *Fund.App. Toxicol.* 16: 449-58.

Güney, M., Demirin, H., Oral, B., Özgüner, M., Bayhan, G., Altuntas, I.(2007). Ovarian toxicity in rats caused by Methidathion and ameliorating effect of vitamins E and C. *Hum Exp.Toxicol.* 26, 491-498.

Gutteridge, J.M., Quinlan, G.J., Mumby, S., Heath, A., Evans, T.W. (1994). Primary plasma antioxidants in adult respiratory distress syndrome patients: changes in iron-oxidizing, iron-binding, and free radical- scavenging proteins. *J Lab Clin Med*; 124, 263-73.

Gutteridge, J.M., Halliwell, M. (2000). Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. *Annals New York Academy of sciences*.

H

Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B.(1974). Glutathione-S-transferase the first step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249, 7130-9.

Halleng, J et al. (2007). Le stress oxydant. *Rev.Med, liege*, 62 (10): 628-638

Hanasaki, Y., Ogawa, S., Fukui, S.(1994). The correlation between active oxygen's scavenging and antioxidative effects of flavonoids, *Free Radical Biology and Medicine*.16, 845–850.

Hayder, N., Bouhlel, I., Skandrani, I., Kadri, M., Steiman, R., Guiraud, P., Mariotte, A.M., Ghedira, K., Dijoux-Franca, M.G., Chekir-Ghedira, L.(2008). In vitro antioxidant and antigenotoxic potentials of myricetin-3-o-galactoside and myricetin-3-o-rhamnoside from *Myrtus communis*: Modulation of expression of genes involved in cell defence system using cDNA microarray. *Toxicology in vitro.* 22, 567-581

Hein, K.E, Tagliaferro, A.R., Bobilya, D.J., (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry metabolism and structure-activity relationships. *Journal of nutritional biochemistry.* 13, 572-584.

Heikal, T.M., EL-Sherbiny, M., Hassan, S.A., Arafa, A., Ghanem, H.Z.(2012). Antioxidant effect of selenium on hepatotoxicity induced by chlorpyrifos in male rats. *Int. J. Pharm. Sci.* 4(20): 0975-1491.

Holmuamedov, E.L., Wang, L., Terzic, A. (1999). ATP-sensitive K⁺ channel openers prevent Ca²⁺ overload in rat cardiac mitochondria *J Physiol.* 519 (1): 347–360.

Hould, R. (1984). *Techniques d'histopathologie et de cytopathologie.* Ed. Maloine, pp. 19-21 ; 225-7.

Hurley, L.S., Keen, C.L., Lonnerdal, B.(1983).Aspects of trace elements interactions during developpement.*Fed. Proc.*42:1735-1739.

I

Ibrahim, M.T., Eljack, B.H., Fadlalla, I.M.T. (2011). Selenium supplementation to broiler diets. *Anim. Sci. J.* 2, 12–17.

Imoberdorf, R., Rühlinb, M., Ballmer, P.E.(2010).Zinc: un oligoélément vital à grand potentiel. *Forum.Med. Suisse.* 10 (44): 764-768.

Istamboulie, G. (2009). Biocapteur associant l'acétylcholinestérase et la phosphotriestérase pour un contrôle environnemental des insecticides organophosphorés. Thèse de doctorat de l'université de Perpignan.

Itano, M.M.D. (1978). Cap Serum Iron Survey (70): 516-522.

J

Jerkovic, J., Mastelic, M., Milos Juteau, F., Masotti, V., Viano, J. (2003). Chemical variability of *Artemisia vulgaris* L. essential oils originated from the Mediterranean area of France and Croatia *Flavour. Fragr. J.* (18): 436–440.

Joa, O., Vasconcelos, M., Artur, M.S.S., Jose, A.S.C. (1998). Chromones and flavones from *Artemisia campestris* Subsp *Maritima*. *Phytochemistry.* 49 (5): 1421-1424.

John, S., Kale, M., Rathore, N., Bhatnagar, D. (2001) Protective effect of vitamin E in dimethoate and malathion induced oxidative stress in rat erythrocytes. *J Nut Biochem* 12:500-504.

Jollow, D.J., Mitchell, 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, 51–157.

Julkunen-Tiitto, R. (1985). Phenolics constituents in the leaves of northern willows: methods for the analysis of certain phenolics, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 33,213–217.

Juteau F., Masotti V., Bessièrè J-M., Viano J. (2002). Compositional characteristics of the essential oil of *Artemisia campestris* var. *glutinosa*. *Bioch. Syst. Ecol.* (30): 1065-1070.

K

Kalender, S., Ogutcu, A., Uzunhisarcikli, M., Acikgoz, F., Durak, D., Ulusoy, Y., Kalender, Y., (2005). Diazinon-induced hepatotoxicity and protective effect of vitamin E on some biochemical indices and ultrastructural changes. *Toxicology*. 211, 197–206.

Kaplan, A. (1984). Glucose. *Clin. Chem. Toronto. Princeton*. 1032-1036.

Kaplan, A. (1984). Urea. *Clin. Chem. Toronto. Princeton*. 1257-1260, 437 and 418.

Kaplan, A. (1984). Bilirubin. *Clin. Chem. Toronto. Princeton*. 1238-1241.

Kaplan, A. (1984). Lipids. *Clin. Chem. Toronto. Princeton*. 918-919.

Kaplan A. (1984). Triglycerides. *Clin. Chem. Toronto. Princeton*. 437.

Karanth, S., Liu, J., Olivier, K., Pope, C. (2004). Interactive toxicity of the organophosphorus insecticides chlorpyrifos and methyl parathion in adult rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 196:183–190.

Khaled, M., Ashry, A., Aqel, W., Abu-Qare Fathy, R., Saleem, A., Yousef, A., Hussein, A., Salah, M., Hamza Amal, M., Kishk, A., Mohamed, B., Abou-Donia. (2002). Inhibition and recovery of maternal and fetal cholinesterase enzymes following a single oral dose of chlorpyrifos in rats. *Arch. Toxicol.* 76, 30–39.

Klaassen, C.D., Watkin, J.B. (1984). Mechanism of formation, hepatic uptake and biliary excretion. *Pharmacol. Rev.* 36, 1–67.

Kolsteren, P. (1992). Kashin-Beck disease. *Ann. Soc. Belg. Med. Trop.* 72, 81–91.

Kono, Y., Fridovich, I. (1983). Functional significance of manganese catalase in *Lactobacillus plantarum*. *J Bacteriol.* 155(2):742-6

Kostaropoulos, I., Papadopoulos, A.I., Metaxakis, A., Boukouvala, E., Papadopoulou-Mourkidou, E. (2001). Glutathione S-transferase in the defense against pyrethroids in insects, *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 31, 313–319.

Koureas, M., Tsakalof, A., Tsatsakis, A., Hadjichristodoulou, C. (2012). Systematic review of biomonitoring studies to determine the association between exposure to

organophosphorus and pyrethroid insecticides and human health outcomes. *Toxicol Lett* 210(2):155–168.

Kumar, S.(2016). Stress exposure results in increased peroxisomal levels of yeast Pnc1 and Gpd1, which are imported via a piggy-backing mechanism. *Biochim Biophys Acta* 1863(1):148-56

Kumar, P.,Karen, S.,Gierke, S.,Matov, A., Danuser, G., Wittmann,T. 2009. 6 895-908 **GSK3 β phosphorylation modulates CLASP–microtubule association and lamella microtubule attachment.** *JCB* vol. 184.

Kundan, S., Anupam, S. (2010). The Genus Artemisia: A Comprehensive Review. *J. Pharm. Biol.*pp:1-K9

Kyeong, W.Y., Anwar, M., Jong, H.K. (2007).Effects of the Aqueous Extract from *Artemisia campestris* ssp. *caudata*on Mycorrhizal Fungi Colonization and Growth of Sand Dune Grasses. *J. Plant. Biology.* 50 (3): 358-361.

L

Lawerys, R.R. (1999). *Toxicology industrielle et intoxication professionnelle.* Masson. Paris, pp : 961.

Lauwerys, R., Lison, D. (2007). *Toxicologie industrielle et intoxication professionnelles,* 5^{ème} Ed. Masson. Paris, pp: 456-461.

Larrey, D. (2005). Hépatotoxicité de la phytothérapie. Service d'hépto-gastroentérologie et transplantation. Cedex 5-Monpellier.pp : 169-178.

Le bourg, E.L., Rattan, S.I. (2006). Can dietary restriction increase longevity in all species, particularly in human beings ? Introduction to a debate among experts. *Biogerontology,* pp: 123-125-135-177.

Lefevre, G., Beljean-Leymarie, M., Beyerle, F., Bonnefont-Rousselot, D., Cristol, J. P., Therond, P., Torreilles, J. (1998).Evaluation of lipid peroxidation by measuring thiobarbituric acid reactive substances. *Ann. Biol. Clin.*56 (3): 305-319.

Lewis, (2007). Risk characterization document: Methidathion (Supracide). Vol 1: Health risk assessment. Department of pesticide regulation. California.

Li, X. (2013). Zinc induced oxidative damage, antioxydants enzymes response and proline metabolism in roats and leaves of wheat plants. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 89, 150-157.

- Li, Y.L., Yeung, C.M., Chiu, L.C.M., Cen, Y.Z., Ooi, V.E.C.** (2009). Chemical composition and antitumor activity of essential oil from the leaves of a medicinal herb *Shefflera heptaphylla*. *Phytother. Res.* 23, 140-142.
- Lotti, M.** (1995). Cholinesterase inhibition: complexities in interpretation. *Clin. Chem.* 41(12): 1814-1818.
- Lugasi, A., Hovari, J., Sagi, K., Biro, L.** (2003). The role of antioxidant phytonutrients in the prevention of diseases. *J. Acta. biologica. szegediensis.* 47 (1-4):119-125. (Cited in Mohammedi Z, 2005)

M

- Manawadi, S., Kaliwal, B.B.** (2010). Methomyl induced alteration in mice hepatic-oxidative status. *International Journal of Biotechnology Applications* 2, pp-11-19.
- Mann, J.** Davidson, R. S., Hobbs, J. B., Banthorpe, D. V., Harborne, J. B. (1994). *Natural Products*. Longman., Ch. 7, 389.
- Mansour, S.A., Mossa, A.T.H.** (2009). Lipid peroxidation and oxidative stress in rat erythrocytes induced by chlorpyrifos and the protective effect of zinc. *Pest. Biochem. Physiol.* 93:34-39.
- Mariani, E., Polidori, M.C., Cherubini, A., Mecocci, P.** (2005). Oxidative stress in brain aging, neurodegenerative and vascular diseases: an overview. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 827, 65–75.
- Mariod, A.A., Elkheir, S., Ahmed, Y.M., Matthaus, B.,** (2010). *Annona squamosa* and *Catunaregam nilotica* seeds, the effect of the extraction method on the oil composition. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 87, 763-769.
- Matin, M.A, Khan, S.N, Hussain, K., Sattar, S.** (1989). Effects of adrenalectomy on diazinon induced changes in carbohydrate metabolism. *Archives of Toxicology.* 63, 376-380.
- Max Marshall, M.D., Shon Lewis, M.D., Austin Lockwood, R.M.N., Richard Drake, P.H.D., Peter Jones, P.H.D., Tim Croudace, P.H.D.** (2005). Association Between Duration of Untreated Psychosis and Outcome in Cohorts of First-Episode Patients. *Rch. Gen. Psychiatry.* 62 (9): 975-983.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Messarrah, M., Boulakoud, M. S., Boumendjel, A., Abdenmour, C., El Feki, A.** (2007).The impact of thyroid activity variations on some oxidizing-stress parameters in rats. *C.R.Biologies*. 330(2):107-112.
- Meiattini, F., Prencipe, L., Bardelli, F., Giannini, G. and Tarli, P.** (1978).The 4-hydroxybenzoate/4-aminophenazone chromogenic system used in the enzymic determination of serum cholesterol. *Clinical Chemistry*, 24: 2161-2165.
- McCauley, L.A., Anger, W.K., Keifer, M., Langley, R., Robson, M.G., Rohlman, D.** (2006). Studying health outcomes in farm worker populations exposed to pesticides. *Envi. Health. Perspectives*. 14(3): 953-960.
- McRae, N.K.,Gaw, S., Glover, C.N.** (2016). Mechanisms of zinc toxicity in the galaxiid fish, *Galaxias maculatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. 179: 184–190.
- Migliorea, L., Coppedè, F.** (2009).Environmental-induced oxidative stress in neurodegenerative disorders and aging. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*.674 (1-2): 73-84.
- Milatovic, D., Gupta, R.C., Aschner, M.** (2008). Anticholinesterase toxicity and oxidative stress. *The scientific world Journal*. 6, 295-310.
- Min, K.J., Cha, C.G., Pependorf, W.** (2005).Determination of urinary metabolites of phosalone, methidathion, and IBP after oral administration and dermal application to rats. *Bull. Environ. Contam. Toxicol*.74, 809-816.
- Mirjalili. M.H., Tabatabaei S.M.F., Hadian J., Nejad S.E.,and Sonboli. A.** (2007).Phenological Variation of the essential oil of *Artemisia scoparia*from Iran. *J. Essent. OilRes*.19 : 326–329.
- Monique, G.A., Dominique, R., Zohreh, A.Z., Jore, D.**(2003). Espèces réactives de l'oxygène : comment l'oxygène peut il devenir toxique ? *L'actualité chimique*. Paris. pp : 91-96.
- Monosson, E., Kelce, W.R., Lambright, C., Ostby, J., Gray, L.E.** (1999).peripubertal exposure to the antiandrogenic fungicide vinclozolin, delays puberty, inhibits the developpement of androgen dependant tissues, and alters androgen receptor function in the male rat. *Toxicol. Indus.Health*. 15, 65-79.
- Morais, S., Dias, E., Pereira, M.L.**(2012). Carbamate: Human exposure and health effect. *Academic publish-the impact of pesticides*, pp: 21-38.
- Murray, R.L.** (1984).Alanine aminotransferase.*Clin. Chem. Toronto. Princeton*.1088-1090.

Murray, R.L. (1984).Aspartate aminotransferase.Clin. Chem. Toronto. Princeton.1112-1116.
Murray, R.L. (1984).Creatinine.Clin. Chem. Toronto. Princeton.1261-1266.

N

Naili, M.B., Alghazeer, O.A., Saleh, N.A., Al-Najjar, A.Y. (2010).Evaluation of antibacterial and antioxidant activities of *Artemisia campestris* (Astraceae) and *Ziziphus lotus* (Rhamnaceae).Arab. J. Chem. 3: 79–84.

Naito, H.K. (1984). Cholesterol.Clin. Chem. Toronto. Princeton. 1194-11206.

Navarro-Alarcon, M., Cabrera-Vique, C. (2008). Selenium in food and the human body: A review. Science of the Total Environment. 400: 115-141.

Nelly, C.B. (2013). Thèse de doctorat en pharmacie : prise en charge des douleurs articulaires par aromathérapie et phytothérapie. Toulouse.

Neve, J., Therond, P. (1991). Le sélénium dans les oligoéléments en médecine et biologie. In: Chappuis, P. Ed. Lavoisier Tec ET Doc. Paris; pp: 260-269.

Nicotera P, Orrenius S.(1986). Role of thiols in protection against biological reactive intermediates, Advances in Experimental Medicine and Biology. 197, 41–49.

Nielsen, J., Jørgensen, H.S.(1995). Metabolic control analysis of the penicillin biosynthetic pathway in a high-yielding strain of *Penicillium chrysogenum*.Biotechnol Prog.11(3):299-305.

Nys, Y. (2001). Oligoéléments, croissance et santé du poulet de chair. INRA. Prod. Anim. 14 (3): 171-180.

O

Okafor, J., Ham, R. (1999). Identification, use and preservation of medicinal plants in the southeast of Nigeria. Thème de la biodiversité Africaine. 3, 1-7.

Omar, S.H. (2010). Oleuropein in Olive and its Pharmacological Effects.Science and Pharmacology.78 (2) : 133–154.

Ojezele, M.O., Abatan, O.M. (2009). Toxicological effects of chlorpyrifos and methidathion in young chickens, Afr.J.Bioch.Res. 3, 048- 051.

P

Paris, M., Hurabielle, M. (1980). Abrégé de Matière Médicale (Pharmacognosie), Tome 1 Paris.

Pelmont, J. (2005). Biodégradations et métabolismes: les bactéries pour les technologies de l'environnement. EDP Sciences : Grenoble.pp: 798 pages.

Perrotta, G. (1984). Iron and iron-binding capacity. Kaplan A et al. Clin Chem The C.V. Mosby Co. St Louis. Toronto. Princeton; 1063-1065.

Pesce, A. (1984). Lactate dehydrogenase. Clin. Chem. Toronto. Princeton. 1124-117.

Pincemail, J.,Meurisse, M., Limet, R., Defraigne1, JO. (1999). L'évaluation du stress oxydatif d'un individu : une réalité pour le médecin. Jrl. Vaisseaux, cœur, poumons. 4 (5).

Pincemail, J., Limet, R., Defraigne, J.O. (2001). Stress oxydant et transmission cellulaire : implication dans le développement du cancer. Medi.Sphere : 134.

Prasad, E.(2009). Is the Chinese Growth Miracle Built to Last? China Economic Review, Vol. 20, No. 3, pp. 103–23.

Puy, H. (2012). Cours N°7 : introduction aux radicaux libres et espèces réactive de l'oxygène. Ronéo(4). Paris, pp :1-12.

Q

Quinn, D. (1987). Acetyl cholinesterase: enzyme structure, reaction dynamics, and virtual transition states. Chemical Reviews. 5: 955-979.

R

Rauter, A.P., Branco, I., Tostao, Z., Pais, M.S., Gonzalez, A.G., Bemejo, J.B. (1989). Flavonoids from Artemisia campestris subsp. Maritime. Phytochemistry. 28, 2173-2175.

Ribereau-Gayon, J., Ribereau-Gayon, P., Peynaud, E., Sudraud, P. (1972). Traité d'oncologie : Sciences et techniques du Vin, tome 1 : Analyse et contrôle des Vins Ed. Dunod. Paris, pp : 671.

Rioux, S. (2002). Les inhibiteurs de l'acétylcholinesterase. Le Medecin du Quebec. 37 (4) : 89-94.

Rosalki, S.B., Foo, A.Y., Dooley, J.S. (1993). Benign familial hyperphosphatasaemia as a cause of unexplained increase in plasma alkaline phosphatase activity. J. Clin. Pathol. 46: 738-741.

Roy, M.S. (2004). Proteinuria in African Americans with type 1 diabetes. J. Diabetes Compli. 18, 69-77.

S

Saïd, L., Banni, M., Kerkeni, A., Saïd, K., Messaoudi, I. (2010). Influence of combined treatment with zinc and selenium on cadmium induced testicular pathophysiology in rat. *Food and Chemical Toxicology*. 48 (10): 2759–2765.

Saihi, R. (2011). Magister chimie "Etude phytochimique, Extraction des produits actifs de la plante *Artemisia campestris* de la région de Djelfa. Mise en évidence de l'activité biologique".

Saissy, J.M., Ruttiman, M. (1999). Intoxication par les organophosphorés. Consensus d'actualisation SFAR-Médecine d'urgence. Paris-France.

Salvayre, N., Salvayre, R. (2005). Effet protecteur des acides gras contre le stress oxydatif : implication en physiopathologie vasculaire. *Ed. OCL*. 5 (2) : 433-438.

Saoudi, M., Abdelmouleh, A., Jamoussi, K., Kammoun, A., El-Feki, A. (2008). Hematological toxicity associated with tissue extract from poisonous fish *Lagocephalus lagocephalus* influence on erythrocyte function in wistar rats. *J. Food Sci*. 73, 155-159.

Saoudi, M., Allagui, M.S, Abdelmouleh A., Jamoussi, K., El-Feki, A. (2010) Protective effects of aqueous extract of *Artemisia campestris* against puffer fish *Lagocephalus lagocephalus* extract induced oxidative damage in rats. *Exp. Tox. Path*, 62, 601-604.

Schlegel, P. (2010). Facteurs de variation de la biodisponibilité du zinc, ajouté sous forme organique et inorganique, chez les deux espèces monogastrique en croissance (poulet et porcelet). *Agro. Paris. Tech.* pp :26-40.

Seboussi, R., Faye, B., Alhadrami, G. (2004). Facteurs de variation de quelques éléments trace (Se, Cu, and Zinc) et d'enzymes témoins de la souffrance musculaire dans le sérum du dromadaire (*camelus dromedarius*) aux Emirats arabes unis. *Rev. Méd. Vét.* 57 (1-2) : 87-94.

Sefi, M., Fetoui, H., Makni, M., Zeghal, N. (2010). Mitigating effects of antioxidant properties of *Artemisia campestris* leaf extract on hyperlipidemia advanced glycation end products and oxidative stress in alloxan-induced diabetic rats. *Food and Chemical Toxicology*. 48, 1986-1993.

Sefi, M., Bouaziz, H., Soudani, N., Boudawara, T., Zeghal, N. (2011). Fenthion induced-oxidative stress in the liver of adult rats and their progeny: Alleviation by *Artemisia campestris*. *Biochem. Physiol.* 101(2): 71-79..

Seve, M., Favier, A. (2002). Métabolisme du zinc. *Encycl. Med. Chir. Endocrinologie-Nutrition*. 359 (10) : 16.

- Silvestri, E., Lombardi, A., de Lange, P., Schiavo, L., Lanni, A., Goglia, F.**(2008). Age-related changes in renal and hepatic cellular mechanisms associated with variations in rat serum thyroid hormone levels. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*
- Shackleton, S.** (1992). Occupational exposure limits Criteria document for hydrogen selenide. Luxembourg.
- Shulz, E., Anter, E., Keaney, J.R., John, F.** (2004). Oxidative stress: Antioxidants and endothelial function. *11 (9): 1093-1104.*
- Simonoff, M., Simonoff, G.** (1991). *Le selenium et la vie.* Masson, Paris.
- Soderlund, D.M.** (2012). Molecular mechanisms of pyrethroid insecticide neurotoxicity: recent advances. *Archive of Toxicology.* 86: 165-181.
- Stevens, A., Lowe, J.S.** (2006). *Histologie humaine.* 3^{ème} Ed. Elsevier. Paris, pp : 243-251.
- Sulak, O., Altuntas, I., Karahan, N., Yildirim, B., Akturk, O., Yilmaz, H.R., Delibas, N.**(2005). Nephrotoxicity in rats induced by organophosphate insecticide Methidathion and ameliorating effects of vitamins E and C. *Pest.Bioch.Physiol.*83, 21-28.
- Sutcu, R., Altuntas, I., Yildirim, B., Karahan, N., Demirin, H., Delibas, N.** (2006). The effects of subchronic methidathion toxicity on rat liver: Role of antioxidant vitamins C and E. *Cell. Biol. Toxicol.* 22, 221-227.

T

- Tabacco, A.** (1979). *Cin Chem;* 25: 336-337. 3.
- Tapiero, H., Townsend, D.M., Tew, K.D.** (2003). The antioxidant role of selenium and seleno-compounds.*Biomedicine & Pharmacotherapy.* 57, 134-144.
- Taylor JR, Selhorst JB, Houff SA, et al.** (1978). Chlordecone intoxication in man: I. Clinical observations. *Neurology* 28:626-630.
- Testud, F., Grillet, J.P.** (2016). *Insecticide organophosphorés, carbamates, pyréthrinoides de synthèse et divers.* Tox. Path. Prof. Elsevier Masson, pp : 1-24.
- Thabet, H., Brahmi, N., Kouraichi, N., Elghord, H., Amamou, M.**(2009). Intoxication par les pesticides organophosphorés: nouveau concepts.18: 633-639.
- Thérond, P., Malvy, D., Favier. A.** (1997). Toxicité du sélénium à doses pharmacologique par voie orale. *Nut. Clin. Metabolism.* 11(2) : 91-101.
- Therond, P.** (2003). Le sélénium : un oligo-élément essentiel pour la santé humaine. *Cahier de Nutrition et Diététique,* 38(4), 250-256.

Thérond, P.D., Bennefont-Rousselot, B. (2005). Système antioxydants endogènes « Radicaux libres et stress oxydant ». Paris. Lavoisier, pp : 87-111.

Thomson, C.D., Stewart, R.D.H. (1974). The metabolism of ⁷⁵Se selenite in young women. Br. J. Nutri. 32, 47.

Trinder, P. (1969). Determination of glucose in blood using oxidase with an alternative oxygen acceptor. Ann. Clin.Biochem. 6: 24-28.

Tinggi, U. (2008). Selenium: its role as antioxidant in human health. Environ. Health Prev. Med. 13, 102-108.

Torres De Pinedo, A., Pen˜alver., P., Morales, J.C. (2007) Synthesis and evaluation of new phenolic-based antioxidants: structure-activity relationship. Food Chem 103, 55–61.

V

Valant-Vetschera, K.M., Fischer R., Wollenweber, E. (2003). Exudate flavonoids in species of *Artemisia* (Asteraceae-Anthemideae): new results and chemosystematic interpretation. Biochem. Syst. Ecol. 31: 487-498.

Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M. (2006).Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. Chem. Biol. Interact. 160:1-40.

W

Wani, H., Shah, S.A., Banday, J.A. (2014). Chemical composition and antioxidant activity of the leaf essential oil of *Artemisia absinthium* growing wild in Kashmir, India .J. Phyto.pharmacol. 3(2): 90-94.

Washburn, A.D.(2003). The environmental fate of Methidathion.Department of pesticide regulation.

Wassmann, S., Wassmann, K., Nickenig, G. (2004).Modulation of oxidant and antioxidant enzyme expression and function in vascular cells. Hyperten.Vol 44: 381-386.

Wenger, C. (1984). Alkaline phosphatase.Clin. Chem. Toronto. Princeton.1094-1098.

Winston, G.W., Di Giulio, R.T. (1991). Prooxidant and anti- oxidant mechanisms in aquatic organisms.Aquat.Toxicol. 19: 137-161.

X

Xu, C., Shu, W.Q., Qiu, Z.Q., Chen, J.A., Zhao, Q., Cao, J. (2007).Protective effects of green tea polyphenols against subacute hepatotoxicity induced by microcystin-LR in mice. Environ. Toxicol. Phar. 24, 140-148.

Y

Yan, H., Chang, H. (2012). Antioxidant and antitumor activities of selenium and zinc enriched Oyster Mushroom in Mice Biological Trace Element Research. 150 (1): 236-241

Yavuz, T., Altuntas, I., Delibas, I., Yildirim, B., Caindir, O., Coral, A., Karahan, N., Ibrisim, E., Kutsal, A. (2004). Cardiotoxicity in rats induced by methidathion and ameliorating effect of vitamins E and C. Hum. Exp. Toxicol. 23, 323-329.

Yi, Z., Yan, Y., Liang, Y., Zeng, B. (2008). In vitro antioxidant and antimicrobial activities of PericarpiumCitriReticulatae of a new Citrus Cultivar and its main flavonoid. LWT. 41, 597- 603.

Yousef, M.I., Demerdash, F.M., Kamei, K.I., Salhen, K.S. (2003). Changes in some hematological and biochemical indices of rabbits induced by isoflavones and cypermethrin. Toxicology. 189, 223-234.

Z

Zheng, Q., Song, J., Doncaster, K., Rowland, E., Byers, D.M. (2007). Qualitative and quantitative evaluation of protein extraction protocols for apple and strawberry fruit suitable for two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry analysis. J. Agric. Food Chem. 55, 1663–1673.



ANNEXE

Composition chimiques de tous les constituants chimiques de l'huile essentielle d'*Artemisia campestris*

Constituants	RT (min)	Composition %
α -pinene	941	20,0
sabinene	977	0,4
β -pinene	981	1,9
myrcene	993	8,3
<i>p</i> -cymene	1028	6,3
limonene	1032	6,5
(<i>Z</i>)- β -ocimene	1042	6,8
(<i>E</i>)- β -ocimene	1052	3,6
γ -terpinene	1063	3,0
terpinolene	1090	0,6
linalool	1101	0,5
α -campholenal	1127	0,4
<i>trans</i> -verbenol	1146	0,4
<i>p</i> -mentha-1,5-dien-8-ol	1168	0,3
4-terpineol	1179	0,5
α -terpineol	1191	0,5
<i>trans</i> -carveol	1219	0,3
(<i>Z</i>)-3-hexenyl isovalerate	1238	0,4
α -copaene	1377	0,3
2-ethylnaphthalene	1385	0,6
β -caryophyllene	1419	0,5
aromadendrene	1440	0,4
alloaromadendrene	1462	0,6
γ -gurjunene	1475	0,4
γ -muurolene	1478	1,9
<i>ar</i> -curcumene	1483	2,6
bicyclogermacrene	1496	1,3
<i>trans</i> - γ -cadinene	1514	0,5
δ -cadinene	1524	1,1
italicene ether (=6,11-oxido-acor-4-ene)	1537	0,4
(<i>E</i>)-nerolidol	1564	1,3
(<i>Z</i>)-3-hexenyl benzoate	1570	0,4
spathulenol	1577	14,7
globulol	1584	1,4
viridiflorol	1591	0,4
5- <i>epi</i> -7- <i>epi</i> - α -eudesmol	1602	0,3
geranyl isovalerate	1609	1,1
T-cadinol	1641	0,9
β -eudesmol	1650	1,2
α -cadinol	1654	1,4
aromadendrene epoxide-(1)	1673	0,5

<i>cis</i> - α -santalol	1682	1,1
Monoterpene hydrocarbons		57,4
Oxygenated monoterpenes		4,0
Sesquiterpene hydrocarbons		10,0
Oxygenated sesquiterpenes		23,2
Apocarotenes		0,0
Non-terpene derivatives		1,4
Total identified		96,0

Full Length Research Paper

Methidathion-induced hematological, biochemical and hepatohistological alterations in rat: Ameliorative effects of selenium and zinc

Leila Barkat^{1,2}, Amel Boumendjel¹, Cherif Abdennour³, Mohamed Salah Boulakoud³, Abdelfattah El Feki⁴ and Mahfoud Messarah^{1*}

¹Laboratory of Biochemistry and Environmental Toxicology, Faculty of Sciences, University of Badji Mokhtar, BP 12 Sidi Amar, Annaba, Algeria.

²Laboratory of Applied Biochemistry and Microbiology, Faculty of Sciences, University of Badji Mokhtar, BP 12 Sidi Amar, Annaba, Algeria.

³Laboratory of Animal Ecophysiology, Faculty of Sciences, University of Badji Mokhtar, BP 12 Sidi Amar, Annaba, Algeria.

⁴Laboratory of Animal Ecophysiology, Faculty of Sciences, Sfax, Soukra road – Km 3.5, BP 802, 3018 Sfax, Tunisia.

Received 3 February, 2015; Accepted 21 May, 2015

The aim of this study was to determine the effect of a sub-acute 4-week exposure to methidathion (MD) on the hematological system and hepatic integrity of rats. We also assessed whether co-administration of micronutrients such as selenium (Se) and zinc (Zn) prevented MD-induced hepatic damage. Rats were randomly divided into four groups of six each: the first group served as a control which received standard diet, the second group received both Se (0.5mg/kg of diet) and Zn (0.227 g/l drinking water), the third group received only MD (5 mg/kg b.w. by gavage using corn oil as a vehicle), and the fourth group received MD and combined selenium and zinc. After four weeks, exposure to MD induced a significant increase in plasmatic activities of AST, ALT, ALP, LDH, and liver malondialdehyde level. In contrast, reduced glutathione level (GSH), and the activities of catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), and the glutathione peroxidase (GPx) content of hepatic tissue decreased significantly. Moreover, treatment with Se and Zn in MD-treated rats maintained all the biochemical parameters cited above. In conclusion, the obtained results indicate the ability of Se and Zn to attenuate the MD-induced liver and erythrocytes oxidative damage.

Key words: Biochemical studies, liver, methidathion, oxidative stress, rat, selenium, zinc.

INTRODUCTION

Organophosphate insecticides (OPIs) are widely used in agriculture, in order to enhance food production against

insects and micro-organisms throughout the world. The predominant action of OPIs is to cause inhibition of acetyl

*Corresponding author. E-mail: mahfoud.messarah@univ-annaba.dz, mmessarahdz@yahoo.fr. Tel: +213 38 87 61 10. Fax: +213 38 87 61 10.

Author(s) agree that this article remain permanently open access under the terms of the [Creative Commons Attribution License 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

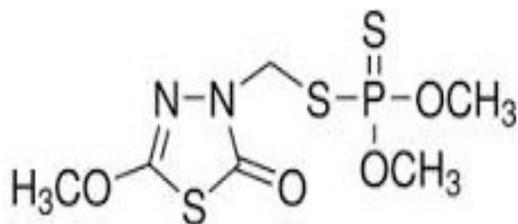


Figure 1. Chemical structure of methidathion.

cholinesterase (AChE) activity in the target tissues leading to the accumulation of acetylcholine substance. The latter represent the chemical mediator of nervous system, and it is responsible for the transmission of nervous function by binding to post synaptic acetylcholine receptors, resulting in muscle contraction or glands secretions (Lauwerys and Lisson, 2007; Abou-Donia, 2010). Chronic and subchronic exposure of OPIs may induce oxidative stress leading to the generation of free radicals and alteration in antioxidants or reactive oxygen species (ROS) scavenging enzymes (Attia et al., 2012). Methidathion (ultracide, GS 13005) S-[(2, 3-dihydro-5-methoxy-2-oxo-1, 3, 4-thiadiazol 3(2H)-yl) methyl] O,O dimethyl phosphorodithioate) (Figure 1) is one of the most widely used OPIs for agriculture and public health programmes (Yavuz et al., 2004). It has been reported that the major route of methidathion metabolism in rat liver was through glutathione-S-transferase and that the predominant metabolite was desmethyl methidathion (Beauvais, 2005). Some previous studies showed the *in vivo* and *in vitro* effect of MD on lipid peroxidation (LPO), and antioxidant enzyme in which a single dose of MD caused elevation in erythrocytes LPO (Altuntas et al., 2002a). In addition, the sub chronic administration of MD may induce biochemical and histopathological changes in different tissues such as liver, kidney and heart. However, the supplementation of antioxidants can be useful to constrain the oxidative damage. The interest in selenium pharmacology and biochemistry has increased since it possesses biological and antioxidant properties as those of vitamin C and D and some micronutrients (Altuntas et al., 2002b; Gokalp et al., 2003; Sulak et al., 2005; Guney et al., 2007a). Also, antioxidant enzymes, that is, superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx), operate in concert together with several other non-enzymatic molecules to contrast the ROS actions and to avoid oxidative damage.

SOD catalyzes the reduction of superoxide anion into hydrogen peroxide, which is subsequently detoxified by CAT and GPx at both intra and extra-cellular levels (Ghalehkandi et al., 2013). In particular, an isoform of SOD has been identified and shown to include Se and Zn at its catalytic site. Consequently, Zn and Se are considered essential for the correct functioning of an organism. Additionally to being a co-factor of SOD, Zn is required, as a functional component, in more than 200

enzymes and transcription factors (Sfar et al., 2009). Zinc is a structural constituent of many proteins, hormones and hormone receptors, which plays a fundamental role in a wide range of biochemical processes, and it is an important modulator in the mammalian central nervous system (CNS). In addition, zinc exhibits both neurotoxic and neuroprotective effect (Nowak, 2000). Zn also functions as an antioxidant; it is a constituent of the antioxidant enzyme superoxide dismutase (Shankar and Prasad, 1998) and maintains the physiological roles of metallothioneins. Furthermore, Zn prevents the reactions between thiols and iron, which give rise to free radicals, and is also an essential constituent of the nucleic acid-repairing enzymes and a membrane stabilizing factor (Savarino et al., 2001). Selenium is also an essential trace element, which plays an antioxidant role, as a selenocysteine residue. The best known biochemical role of Se is to be a part of the glutathione peroxidase active site (Kralj and Gorup, 2004). Selenium was demonstrated to be a modulator of oxidative stress response, where its supplementation could prevent chronic degenerative diseases (Rayman, 2002).

Furthermore, some investigators confirms that the interactions between zinc and selenium are not really apparent, and the mode of interaction could be by the competition for a common ligand or transport sites, so, one element may be involved in the metabolism of the other (House and Welch, 2014). However, it has been established that the co administration of Se and Zn together exercise a synergistic effect against the oxidative stress induced by cadmium (El Heni et al., 2009). Most previous reports in the field of pesticides and oxidative stress were performed by using single intoxication on animal models. For this reason, the present study was undertaken to evaluate the effect of a sub-chronic exposure of methidathion not only administered alone, but also in combination of two micronutrients Se and Zn to male rats. Therefore, the aim of this study was to (i) evaluate the effect of methidathion on biochemistry, lipid peroxidation and enzyme activities and to (ii) investigate the combined administration of selenium and zinc in alleviating the methidathion induced toxicity.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals and reagents

A commercial formulation of methidathion, named 'Supracide[®], Syngenta Crop Protection Pty Limited)' was used in the experiments. All other chemicals used in this study were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, Missouri, USA).

Animals and treatment

Twenty eight (28) male Wistar rats (weighing 270 to 290g) were obtained from the Pasteur Institute (Algiers, Algeria). Animals were acclimated for two weeks under the same laboratory conditions of

photoperiod, relative humidity (40%) and temperature ($24\pm 2^\circ\text{C}$). A standard diet, supplied by the "ONAB, El-Harrouch", Algeria and water *ad libitum* were provided. Rats were randomly divided into four groups of seven individuals each as follows. The first group was served as a control. The second group (Se+Zn) was given daily selenium as sodium selenite (Na_2SeO_3) at a dose of 1.5 mg/kg diet, and Zinc ($\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$) at a dose of 0.227 g/l water. The third group (MD) was administered at a dose of 5 mg/kg b.w. by gavage using corn oil as a vehicle. Rats in the fourth group (MD+Se+Zn) were treated with MD, Se and Zn. Only corn oil was given in the same way to the control group. The dose of MD used in this study represents 1/15 of LD_{50} (5 mg/kg bw) which has been used previously by other investigators since it is toxic but not lethal to rats (Sutcu et al., 2006; Güney et al., 2007). The doses of Na_2SeO_3 and ZnSO_4 were selected based on the clinical application and on results from previous experiments in human and experimental animals against heavy pesticide poisoning (Goel et al., 2005; Mansour and Mossa, 2009; Ben Amara et al., 2011). Rats were administered, their respective doses every day for four weeks. The experimental procedures were carried out according to the National Institute of Health Guidelines for Animal Care and approved by the Ethics Committee of our Institution. The amount of ingested diet was calculated as the difference between the weight of feed that remained in the food bin (D_1) and the amount placed 1 day before (D_2). These data were then used to calculate the daily average feed intake, according to the formula:

Average feed intake: $D_2 - D_1$

At the end of the experiment, body weights of rats were recorded. Animals were then sacrificed by cervical decapitation without anesthesia to avoid animal stress and liver was immediately removed and weighed; the organ weight ratio was then calculated. The relative weight of organs (%) was calculated as g/100 g body weight. Blood samples were collected in EDTA tubes and centrifuged at 2200 g for 15 min at 4°C alanine transaminase (ALT), aspartate transaminase (AST), alkaline phosphatase (ALP) and lactate dehydrogenase (LDH).

Hematological variables

Red blood cells (RBCs) count, hemoglobin (Hb) concentration, hematocrit, mean corpuscular volume, mean corpuscular Hb and mean corpuscular Hb concentration were measured by electronic automate coulter MAXM (Beckman Coulter, Inc., Fullerton, California, USA).

Tissue preparation

About 1 g of liver was homogenized in 2 ml of buffer solution of phosphate buffered saline 1:2 (w/v; 1 g tissue with 2 ml PBS, pH 7.4). Homogenates were centrifuged at 10,000 g for 15 min at 4°C , the supernatants were divided into aliquots, then stored at 20°C , and then used for the determination of malondialdehyde (MDA), reduced glutathione (GSH) levels and the activities of the antioxidant enzymes SOD, CAT, and GPx.

Estimation of plasma biochemical parameters

Different biochemical parameters were assayed spectrophotometrically using commercially available kits from Spinreact (Spain, Refs: Bilirubin-1001044, total protein-1001291GOT-1001165, GPT-1001175, ALP-1001131, and LDH-SP41214).

Estimation of lipid peroxidation

The lipid peroxidation level of liver homogenate was measured as malondialdehyde (MDA), which is the end product of lipid peroxidation, and reacts with thiobarbituric acid (TBA) as a TBA reactive substance (TBARS) to produce a red colored complex, which has peak absorbance at 532 nm according to Buege and Aust (1984) 125 μl of supernatant was homogenized by sonication with 50 μl of PBS, 125 μl of TCA-BHT (trichloroacetic acid- butylhydroxytoluene) in order to precipitate proteins, and then centrifuged (1000 g, 10 min, and 4°C). After that, 200 μl of supernatant were mixed with 40 μl of HCl (0.6 M) and 160 μl of TBA dissolved in Tris, and the mixture was heated at 80°C for 10 min. The absorbance of the resultant supernatant was read at 530 nm. The amount of MDA was calculated using a molar extinction coefficient of $1.56 \times 10^5 \text{ M/cm}$ (Draper and Hadley, 1990).

Estimation of reduced glutathione

Liver GSH content was estimated using a colorimetric technique, as mentioned by Ellman (1959), and modified by Jollow et al. (1974) based on the development of a yellow colour when DTNB [(5,5 dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)] is added to compounds containing sulfhydryl groups. Briefly, 0.8 ml of liver supernatant was added to 0.3 ml of 0.25% sulphosalicylic acid and tubes were centrifuged at 2500 g for 15 min. Supernatant (0.5 ml) was mixed with 0.025 ml of 0.01 M DTNB and 1 ml phosphate buffer (0.1 M, pH 7.4). Finally, absorbance at 412 nm was recorded. Total GSH content was expressed as nmol GSH/mg protein.

Measurement of glutathione-S-transferase (GST) activity

Glutathione-S-transferase (GST) (EC 2.5.1.18) catalyzes the conjugation reaction with glutathione in the first step of mercapturic acid synthesis. The activity of GST was measured according to the method of Habig et al. (1974). P-nitrobenzylchloride was used as substrate. The absorbance was measured spectrophotometrically at 340 nm at 30 s intervals for 3 min.

Measurement of antioxidant enzyme activities

Measurement of glutathione peroxidase activity

Glutathione peroxidase (GPx) (E.C.1.11.1.9) activity was measured by the procedure of Flohe and Gunzler (1984). Supernatant obtained after centrifuging 5% liver homogenate at 1500 g for 10 min followed by 10000 g for 30 min at 4°C was used for GPx assay. 1 ml of reaction mixture was prepared which contained 0.3 ml of phosphate buffer (0.1 M, pH 7.4), 0.2 ml of GSH (2 mM), 0.1 ml of sodium azide (10 mM), 0.1 ml of H_2O_2 (1 mM) and 0.3 ml of liver supernatant. After incubation at 37°C for 15 min, reaction was terminated by addition of 0.5 ml 5% TCA. Tubes were centrifuged at 1500 g for 5 min and the supernatant was collected. 0.2 ml of phosphate buffer (0.1 M, pH 7.4) and 0.7 ml of DTNB (0.4 mg/ml) were added to 0.1 ml of reaction supernatant. After mixing, absorbance was recorded at 420 nm.

Measurement of catalase activity

The catalase (E.C.1.11.1.6) activity was measured according to Aebi (1974). This assay is based on the ability of the enzyme to induce the disappearance of hydrogen peroxide. The reaction mixture consist of 780 μl phosphate buffer (pH 7.5), 200 μl of

Table 1. Changes in body, absolute and relative liver weights, and the food intake of control and rats treated with selenium plus zinc (Se+Zn), methidathion (MD) or their combination (MD+Se+Zn) after 4-week treatment.

Parameter	Treatment groups			
	Control	Se+Zn	MD	MD+Se+Zn
Initial body weight (g)	315.62±3.18	303.25±2.71	316 ± 3.9	304.62±4.14
Final body weight (g)	347.5±5.86	342.75±3.89	296.6±3.9*	311±4.34
Absolute liver weight (g)	10.93 ± 0.34	11.88±1.36	12.22±1.07*	11.61±1.97
Relative liver weight (g/100 g b.w.)	3.674±0.12	3.96±0.45	4.07±0.3**	3.87± 0.66
Food intake (g/day/rat)	20.68±1.17	19.43±3.0	16.38±2.17*#	19.47± 2.72

Values are given as mean ± SEM for group of 7 animals each. Significant differences: *Se+Zn, MD, MD+Se+Zn groups compared with control group (*p≤0.05; **p≤0.01). # MD+Se+Zn group compared with MD group (#p≤0.05).

hydrogen peroxide (500 mM) and 20 µl supernatant in a final volume of 1 ml. Absorbance was recorded at 240 nm every 15 s for 1 min. The enzyme activity was calculated by using an extinction coefficient of 0.043 mM cm⁻¹.

Measurement of superoxide dismutase activity

The method of the determination of SOD (E.C.1.15.11) activity by the nitroblue tetrazolium (NBT) test is a method of photoreduction of riboflavin/methionine complex that generates superoxide anion. The oxidation of the NBT by the anion superoxide O₂⁻ is used as the basis for the presence of SOD detection. In aerobic environments the riboflavin, methionine, and NBT mixture gives a blue color. The presence of SOD inhibited the oxidation of the NBT. SOD activity was estimated by the procedure of Beauchamp and Fridovich (1971). Briefly, 5 µl of the supernatant was combined with 1 ml of EDTA/methionine (0.3 mM), 1890 µl phosphate buffer (pH 7.8), 85 µl of 2.6 mM NBT and 22 µl of riboflavin (0.26 mM) was added as the last and the light was switched. The reaction changes in absorbance at 560 nm were recorded after 20 min.

Measurement of protein content

The protein contents of various samples were determined by the method of Bradford (1976) using bovine serum albumin as a standard.

Histopathological analysis

For histopathological analysis, the liver tissues were dissected and the tissue samples were immediately fixed in formalin solution, embedded in paraffin. The paraffin sections were cut into 5 µm thick slices and stained with hematoxylin and eosin (H&E) for light microscopic examination. The sections were viewed and photographed by a compound binocular light microscope (Hould, 1984).

Statistical analysis

Data are expressed as means ± SEM. Data comparisons were carried out by using one way analysis of variance followed by Student's t-test to compare means between the different treatment groups. Differences were considered statistically significant at p≤ 0.05.

RESULTS

Effects of treatment on general rat health

In our study, there were no deaths in any of the groups during the treatment period (4 weeks). During the experiment, rats in the control group and in the Se+Zn-treated group did not show any sign of toxicity. However, MD-treated group of rats showed varying degrees of clinical signs including huddling, depression (Diarrhea, changes in appetite weight, balance disorder), mild tremor and dyspnea. The observed signs were related to the cholinergic crisis, a consistent sign in acute organophosphate poisoning. None of these clinical manifestations were observed in the MD+se+Zn treated rats. As shown in Table 1, the decrease in body weight of MD group was associated with the reduction in food intake by 21%. Beside, co-administration of Se plus Zn with MD showed an improvement of the consumption in food intake by 20% as compared to the MD-treated group.

Effects of treatments on body and liver weights

The variations in the body and relative liver weights of male rats in control and treatment groups are given in Table 1. During the course of present work, it was observed that the body weights of control and Se+Zn treated group, increased progressively throughout the study. However, the exposure of MD resulted in the loss of body weight by 15%. Treatment with Se plus Zn led to an improvement in the body weight of the MD-treated rats by 10% as compared to the control group. Beside, a significant increase of MD-treated rats in absolute and relative liver weights was recorded (11.75 and 11%, respectively) compared to the controls, and by 5 and 4.8%, respectively, compared to the MD-treated group.

Effects of treatments on hematological parameters

Hematological parameters in control and treated groups

Table 2. Changes of hematological parameters of control and rats treated with selenium plus zinc (Se+Zn), methidathion (MD) or their combination (MD+Se+Zn) after 4-week treatment.

Parameter	Treatment groups			
	Control	Se+Zn	MD	MD+Se+Zn
RBC count(10^6 /ml)	5.94±0.6	4.77±1.32	4.087 ± 0.57**	5.23±0.14
WBC (10^3 /ml)	4.61±0.1	6.02±0.17	4.83±0.18	7.48±0.51*
Hb (g/dl)	9.48±0.12	8.4±0.23	7.68 ±0.21*	8.98±0.27
PLT (10^3 /ml)	365.1±7.32	376±12.47	349.7±8.53	397.75±20.5#
HT (%)	25.21±0.5	23.74±0.71	28.61±0.74	26.15±0.76
VMC (mm^3 /RBC)	50.04±1.05	49.4±2.32	40.46± 1.78	49.76±2.42
TCMH (pg/RBC)	16.8±0.35	17.68±0.12	17.17± 0.19	17.06±0.83
CCMH (g/dl)	34.53±0.45	35.85±0.27	34.03±0.28	34.36±0.43

Values are given as mean ± SEM for group of 7 animals each. Significant differences: * Se+Zn, MD, MD+Se+Zn groups compared with control group (* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$). # MD+Se+Zn group compared with MD group (* $p \leq 0.05$).

Table 3. Changes in biochemical parameters of control and rats treated with selenium plus zinc (Se+Zn), methidathion (MD) or their combination (MD+Se+Zn) after 4-week treatment.

Parameter	Treatment groups			
	Control	Se+Zn	MD	MD+Se+Zn
Bilirubin (mg/dl)	4.6±0.25	3.75±0.7	2.7±0.12*	3.0±0.92
Total protein (g/dl)	6.88±0.32	6.78±0.63	4.7 ± 0.38**	6.37±0.51
Cholesterol (mg/dl)	102.09±2.35	102.07±5.16	116±3.32**	106.11±6.28##
Triglycerides (mg/dl)	92.5±4.24	96.6±6.24	82.21±4.14*	95.7 ± 3.3
AST (U/L)	191.12±6.02	170.75±5.91	267.57±6.35***	153.25±1.98***, ##
ALT (U/L)	111.87±2.73	117.62±1.66	202±1.51***	189.5±1.48*#
ALP (U/L)	260.66±12.1	239.2±11.03	368.75±10.09***	300.71±13.34*
LDH (U/L)	1827.26 ± 63.82	1792.6±50.23	2585±45.4**	1353.86±32.23***, #

Values are given as mean ± SEM for group of 7 animals each. Significant differences: *Se+Zn, MD, MD+Se+Zn groups compared with control group (* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$), #MD+Se+Zn group compared with MD group (* $p \leq 0.05$; ## $p \leq 0.01$).

are shown in Table 2. Red blood cells (RBCs), haemoglobin (Hb) content in MD-treated group were significantly decreased compared to those in the controls. While, co-administration of Se plus Zn with MD showed an improvement of RBCs and Hb levels by 29 and 8%, respectively, as compared to control and by 22 and 7%, respectively, as compared to the MD-treated group.

Effects of treatments on biochemical parameters

Total protein, bilirubin, cholesterol, triglycerides, AST, ALT, ALP, and LDH are indicators of hepatic function. As shown in Table 3, compared to the control group, the MD-treated group had significantly lower total protein and bilirubin levels, and significantly elevated ($P < 0.001$) AST, ALT, ALP, and LDH activities ($P < 0.01$). In the current experimental study, MD treatment caused significant increase in the levels of cholesterol and a significant increase in triglyceride level as compared to the control group. Supplementation of Se and Zn to the MD-treated group produced recovery in the above mentioned biochemical variables.

Effects of treatments on hepatic oxidative stress parameters

Table 4 summarizes the changes of liver oxidative injury. Exposure to methidathion in rats produced significant adverse effects on the redox status of liver, which is evidenced by a significant reduction in antioxidant enzymes activities as seen with GPx (21%), CAT (16%) and SOD (26%) and a significant decrease (19%) in GST activity in liver compared with control group. These changes were accompanied by a significant increase (23%) in MDA level and depletion (33%) in GSH content. On the other hand, co-administration of selenium plus zinc with MD produced recovery in the above mentioned hepatic oxidative stress parameters.

Histopathological changes of liver

Liver of the control group had regular histological structure with a characteristic pattern of hexagonal lobules (Figure 4A). Accordingly, no histological alterations were observed in the liver of Se+Zn-treated

Table 4. Activities of antioxidant enzymes of control and rats treated with selenium plus zinc (Se+Zn), methidathion (MD) or their combination (MD+Se+Zn) after 4-week treatment.

Parameter	Treatment group			
	Control	Se+Zn	MD	MD+Se+Zn
Glutathione peroxidase ^a	16.44±0.33	16.54±0.51	12.33±0.164 [*]	18.17±0.326 [#]
Catalase ^b	36.48±0.73	38.97±0.27	30.74±0.42 [*]	40.6±1.08 [#]
Superoxide dismutase ^c	25.24±0.62	20.01±1.28	18.58±0.13 [*]	23.17±0.42 [#]

Values are given as mean ± SEM for group of 7 animals each. Significant differences: ^{*}Se+Zn, MD, MD+Se+Zn groups compared with control group (^{*}p≤0.05). [#]MD+Se+Zn group compared with MD group ([#]p≤0.05). ^aGlutathione peroxidase: nmoles of GSH/min/mg protein. ^bCatalase: μmoles H₂O₂ degraded/min/mg protein. ^cSuperoxide dismutase: units/mg protein.

Table 5. Semiquantitative scoring of histopathological changes in the liver sections of control and rats treated with selenium plus zinc (Se+Zn), methidathion (MD) or their combination (MD+Se+Zn) after 4-week treatment.

Parameter	Treatment groups			
	Control	Se+Zn	MD	MD+Se+Zn
Mononuclear cell infiltration	-	-	++	-
Hepatic hemorrhage	-	-	++	+
Necrosis	-	-	++++	-
Dilation of sinusoids	-	-	++++	-
Vascular congestion	-	-	+++	-

(-) indicates normal, (+) indicates mild, (++) indicates moderate, (+++) indicates severe, and (++++ indicates extremely severe.

group (Figure 4B). In contrast, in MD-treated animals, sub chronic of MD administration for four weeks (Figure 5), led to mononuclear cell infiltration, necrosis, dilation of sinusoids and vascular congestion (Figure 4C to D). Whereas, in MD+Se+Zn-treated group, dilation of sinusoids and vascular congestion were less in comparison to the MD treated group (Figure 4E). The histopathological changes are graded and summarized in Table 5. Histological grading was made according to five severity grades: (-) indicates normal, (+) indicates mild, (++) indicates moderate, (+++) indicates severe, and (++++ indicates extremely severe.

DISCUSSION

Pesticide hazards have been accentuated by the sharp rise in their agricultural, industrial and domestic use. Acute exposure to pesticides can cause oxidative damage. The current study investigated the potential ability of Se and Zn, to reduce oxidative damage induced by MD, an organophosphate pesticide. OPs cause a reduction of body weight in experimental animals (Güney et al., 2007; Kalender et al., 2007; Ogutcu et al., 2008). The findings from the present work indicate that excessive MD exposure has changed body weight, absolute and relative liver weights, leading however to significant decrease in animal growth and production

performances. This could be probably attributed to the reduction of feed consumption and/or malabsorption of nutrients induced by MD effects on the gastro-intestinal tract and/or inhibition of protein synthesis. MD exposure may account to reduced food intake seen in the MD-treated group. Hence, these findings were similar to the results published by Ogutcu et al. (2008) and Messarah et al. (2012) who reported that OPs exposure have significantly induced disturbances of the total body weight, absolute and relative liver weights of rats. In the present study, the exposure of rats to MD induced hematological changes (essentially RBC and Hb). Our results corroborated with the findings of Ojezele and Abatan (2009), who reported a reduction in RBC and Hb in MD treated group, which can be attributed to intravascular haemolysis, anemia, or to haemopoiesis depression. On the other hand, the Hb is found to be a major source of radical production when it interacts with redox xenobiotics (French et al., 1978; Rifkind and Nagababu, 2013).

Liver is the target organ of OPs toxicity (Mazumder, 2005), and the leakage of hepatic enzymes such as ALT, AST and ALP are commonly used as an indirect biochemical index of hepatocellular injury (Klaassen and Watkin, 1984). In the present finding, MD intoxication caused a significant increase in the status of the serum ALT, AST, ALP and LDH activities and that might be related to the release of these enzymes from the

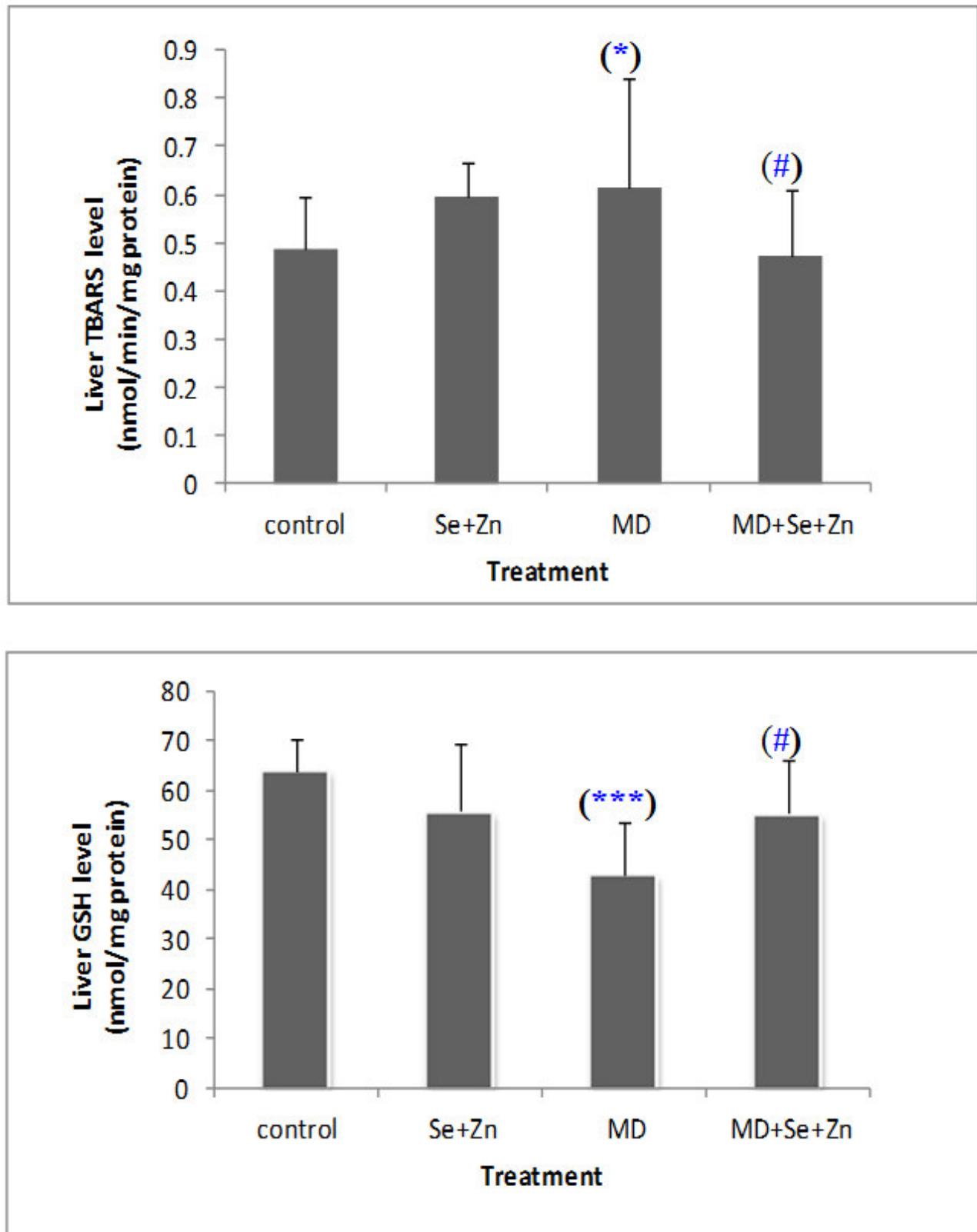


Figure 2. Liver malondialdehyde (nmol/mg prot.) and reduced glutathione (nmol/mg prot.) levels of control and rats treated with selenium plus zinc (Se+Zn), methidathion (MD) or their combination (MD plus Se+Zn) after 4-week treatment. Values are given as mean \pm SEM for group of 7 animals each. *MD and MD+Se+Zn groups compared with control group (* p \leq 0.05; *** p \leq 0.001). # MD+Se+Zn group compared with MD group (# p \leq 0.05).

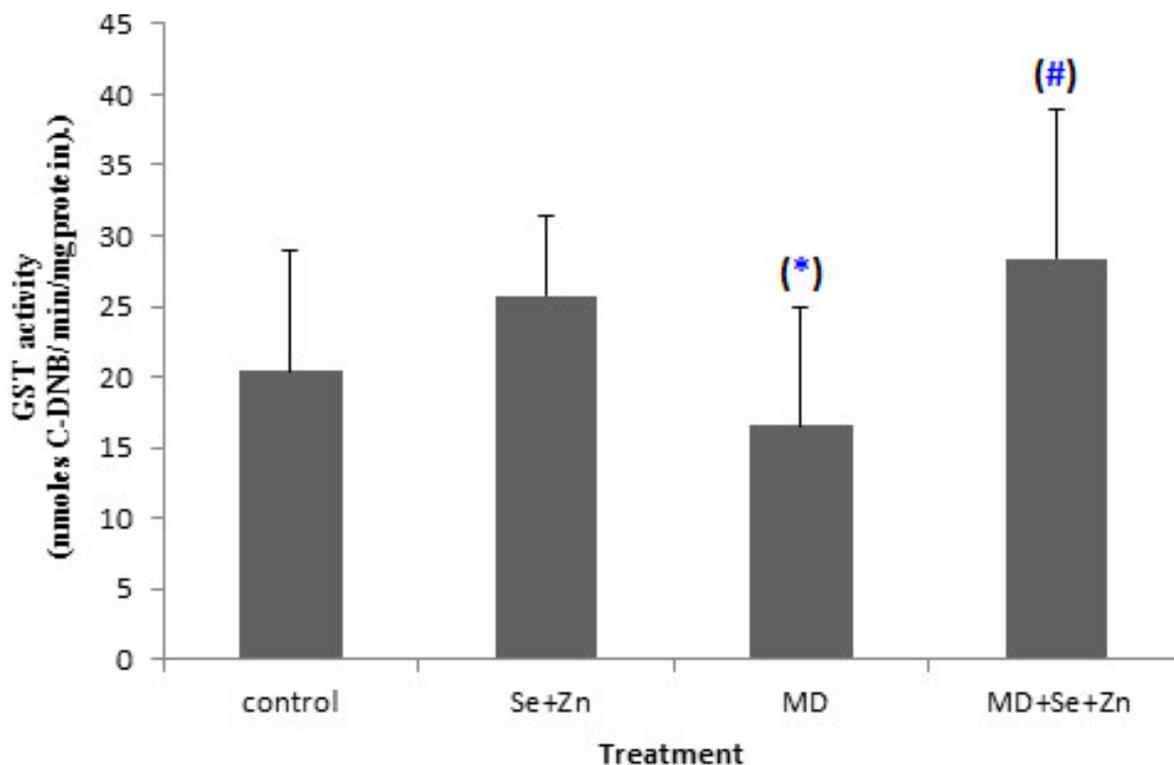


Figure 3. Liver glutathione-S-transferase (nmoles C-DNB conjugate formed/min/mg protein) activity of control and rats treated with selenium plus zinc (Se+Zn), methidathion (MD) or their combination (MD plus Se+Zn) after 4-week treatment. Values are given as mean \pm SEM for group of 7 animals each. * MD and MD+Se+Zn groups compared with control group (* p \leq 0.05). #MD+Se+Zn group compared with MD group (# p \leq 0.05).

cytoplasm into the blood stream rapidly after the rupture of plasma membranes and cellular damage caused by the free radicals produced during the MD metabolism. These results are consistent with the previous findings realized by some researchers who had found an association between OPs toxicity and the increased oxidative stress of rats (Sefi et al., 2011; Attia et al., 2012). Consequently, these biochemical changes could be correlated with histological alterations. In fact, the actual study suggests that MD produces various pathological perturbations in liver such as bleeding, mono nuclear cell infiltration, vascular congestion, dilation of sinusoids and necrosis. These observations possibly come from the toxic effects of generated reactive oxygen species which upset the liver membrane components. Similarly, OP-treated rats have experienced almost the same perturbations including inflammation, and hepatocellular degeneration (Gokalp et al., 2003; Kalender et al., 2010; Sutcu et al., 2006). However, the co-treatment of Se plus Zn has reduced the histological alterations induced by MD, which might be attributed to their antiradical/antioxidant roles. Moreover, these results are in good accordance with those obtained by other studies which have postulated the beneficial role of Se and Zn on histopathological and enzymatic changes of

rats (Goel et al., 2005; Ben Amara et al., 2010; Heikal et al., 2012). Though, the beneficial role of Se and Zn in reducing oxidative stress parameters in the present study might be related to its mild antioxidant potential against toxins induced hepatotoxicity. The observed increase of plasma cholesterol level is associated with the decline of plasma triglycerides; in MD exposed rats is probably a potential indicator for fatty acid metabolism, and implicitly of a possible membrane lipid peroxidation. To disclose the matter, MDA hepatic quantification was tested and found to be higher, indicating lipid peroxidation resulting from exposure to MD. Thus, it becomes conceivable that the observed alteration in circulating cholesterol and triglycerides levels may be a consequence of membrane lipid peroxidation and free radical release.

In the present investigation, significant decrease in plasma proteins and bilirubin concentration were recorded in MD treated rats. Similarly, it has been reported that the decrease in the protein concentration of MD-treated rats is likely originated from alterations in protein synthesis and/or metabolism (Chinoy and Memon, 2001). The administration of Se plus Zn with MD has certainly protected the liver function from MD intoxication as indicated by the significant restoration of plasma biochemical indicators such as cholesterol,

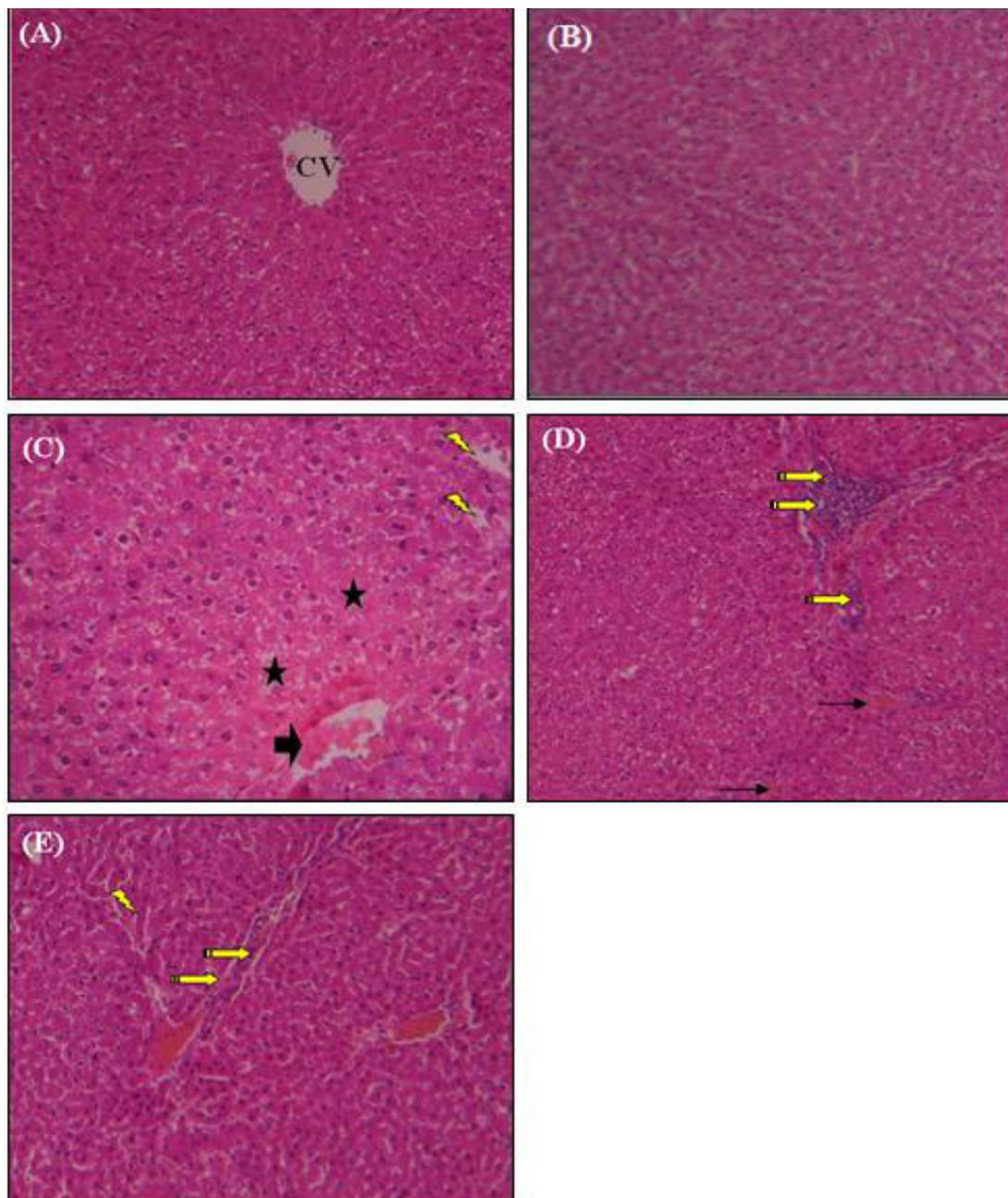


Figure 4. Effect of methidathion (MD) and selenium plus zinc (Se+Zn) co-administrated with MD on histopathological damages in the liver. Controls (A, x100), treated with Se+Zn (B, x100), MD (C and D, x250) and Se plus Zn co-administrated with MD (E, x100) after 4 weeks of treatment, as revealed by photomicrograph of H&E. CV: Central vein. Vascular congestion (↘), mononuclear infiltration (→), dilation of sinusoids (★), and hemorrhage (→) and necrosis (↗).

triglycerides, proteins and bilirubin. OPIs induce reactive oxygen species and subsequent depletion of antioxidant cell defenses can result in disruption of the pro-oxidant/antioxidant balance in mammalian tissues (Valko et al., 2006). Also, OPIs generates reactive oxygen species (ROS) and causes organ toxicity. Consequently, ROS directly react with cell biomolecules, causing

damages to lipids, proteins and DNA, and hence leading to cell death (Halliwell and Gutteridge, 2002). However, lipid peroxidation is a basic cellular deteriorating process induced by oxidative stress and occurs readily in the tissues rich in highly oxidisable polyunsaturated fatty acids (Halliwell, 1994). MDA is a marker of membrane LPO resulting from the interaction of ROS and the cellular

membrane (Ganey et al., 2007a; 2007b). In our previous studies, pesticides such as diazinon and methomyl (Messarah et al., 2012; Djefal et al., 2012) caused a significant increase in LPO in a manner similar to the present study and, in addition, treatment with a combination of Se and Zn after the administration of MD led to a significant decrease in LPO levels. The significant drop in GSH levels promoted by MD caused a reduction in the effectiveness of the antioxidant enzyme defense system, sensitizing the cells to ROS (Altuntas et al., 2002a). Thus, the decreased GSH levels have caused a decline in GPx activity, which leads to possible hepatic oxidative injury. It can be suggested that the reduction, especially in GPx activity seen in this study, is in accordance with these pathologic processes. This situation may be caused by the diminution in SOD and CAT activities, as a result of reduced GPx activity in the present investigation. Under these circumstances, the endogenous antioxidant enzymes are likely to be perturbed because of over-production of oxygen radicals, inactivation of detoxification systems, consumption of antioxidants, and failure to adequately restock tissue antioxidants.

GST may play an important role in cellular detoxification of ionizing radiation in human (Movafagh et al., 2005). A significant decrease of GST activity in rats treated with MD was observed. This is in good accordance with the study of Attia et al. (2012), which correlate the significant reduction of GST by the decrease in GSH and glutathione dependent enzyme system. The actual results revealed that MD caused a statistically significant decrease of liver SOD activity. Thus, the supplementation of Se and zinc to MD treated groups has normalized the levels of SOD. These results agree with previous study on rat liver (Altuntas et al., 2002b) regarding the effect of MD *in vivo*. The decrease in the activity of superoxide dismutase in MD-intoxicated animals may be owed to the consumption of this enzyme in converting the O_2^- to H_2O . The dismutation of O_2^- to H_2O is catalyzed by SOD which contains both copper and zinc. The latter is known to induce the production of metallothionein, which is very rich in cysteine, and is an excellent scavenger of HO^\cdot (Mansour and Mossa, 2009). Furthermore, the NADPH oxidases are a group of plasma membrane associated enzymes, which catalyze the production of O_2^- from oxygen by using NADPH as the electron donor. Zinc is reported to be an inhibitor of this enzyme (Prasad, 2008).

Conclusion

In conclusion, this study demonstrates that exposure to MD provoked hepatotoxicity by inducing lipid peroxidation and depletion in antioxidant enzyme activities of rats. However, Se and Zn treatment could improve the histological alteration induced by MD which could be related to the antioxidant efficacy of the synergy effect given by

by selenium and zinc. Similarly Se and Zn could protect liver against MD toxicity by reducing MDA level and increasing the activities of antioxidant enzymes. Thus to cope with MD toxicity, more attention is needed to limit its use, in one hand, and to supplement food with antioxidants as that of Se and Zn, on the other hand.

Abbreviations: MD, Methidathion; ALT, alanine transaminase; AST, aspartate transaminase; ALP, Alkaline phosphatase; LDH, lactate dehydrogenase; CAT, catalase; GPx, glutathione peroxydase; GSH, reduced glutathione; GST, glutathione S-transferase; LPO, lipid peroxide; MDA, malondialdehyde; O_2^- , superoxide anion; $^\cdot OH$, hydroxyl radical; ROS, reactive oxygen species; SOD, superoxide dismutase; TBA, thiobarbituric acid; TBARS, TBA reactive substances.

Conflict of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

REFERENCES

- Abou-Donia MB (2010). Organophosphorus Ester-Induced Chronic Neurotoxicity. Arch. Environ. Health. 52:484-497.
- Aebi H (1974) Catalase, in: Bergmeyer H.U (ed.), Methods of Enzymatic Analysis. Academic press, New York, pp. 673-884.
- Altuntas I, Delibas N, Demirci M, Tamer N (2002b). The effects of methidathion on lipid peroxidation and some liver enzymes: role of vitamins E and C. Arch. Toxicol. 76:470-73.
- Altuntas I, Delibas N, Sutcu R (2002a). The effects of organophosphate insecticide methidathion on lipid peroxidation and anti-oxidant enzymes in rat erythrocytes: role of vitamins E and C. Hum. Exp. Toxicol. 21:681-85.
- Attia AA, El Mazoudy RH, El-Shenawy NS (2012). Antioxidant role of propolis extract against oxidative damage of testicular tissue induced by insecticide chlorpyrifos in rats. Pest. Biochem. Physiol. 103:87-89.
- Beauchamp C, Fridovich I (1971). Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable 580 to acryl amide gels. Anal. Biochem. 44:276-287.
- Beauvais S (2005). Estimation of exposure of persons in California to pesticide products that contain methidathion. California environmental protection agency HS-1805.
- Ben Amara I, Soudani N, Hakim A, Bouaziz H, Troudi A, Zeghal KM, Zeghal N (2011). Dimethoate-induced oxidative damage in erythrocytes of female adult rats: possible protective effect of vitamin E and selenium supplemented to diet. Toxicol. Ind. Health. 28(3): 222-237.
- Ben Amara I, Soudani N, Troudi A, Bouaziz H, Boudawara T, Zeghal N (2010). Antioxidant effect of vitamin E and selenium on hepatotoxicity induced by dimethoate in female adult rats. Ecotoxicol. Environ. Saf. 74:811-819.
- Bradford MA (1976). Rapid and sensitive method for the quantities of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein binding. Anal. Biochem.72:248-254.
- Buege JA, Aust SD (1984). Microsomal lipid peroxidation. Methods enzymol. 105: 302-310.
- Chinoy NJ, Memon MR (2001) Beneficial effects of some vitamins and calcium on fluoride and aluminium toxicity on gastrocnemius muscle and liver of male mice. Fluoride. 34: 21-33.
- Djefal A, Messarah M, Boumendjel A, Kadeche L, El Feki A (2012). Protective effects of vitamin C and selenium supplementation on methomyl-induced tissue oxidative stress in adult rats. Toxicol. Ind. Health. pp. 1-13.

- Draper HH, Hadley M (1990). Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods. Enzymol.* 186: 421-431.
- El Heni J, Messaoudi I, Hammouda F, Kerkeni A (2009). Protective effects of selenium (Se) and zinc (Zn) on cadmium (Cd) toxicity in the liver of the rat: Effects on the oxidative stress. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72: 1559-1564.
- Ellman GL (1959) Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* pp. 8270-8277.
- Flohe L, Gunzler WA (1984). Analysis of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.* 105:114-121.
- French JK, Winterbourn CC, Carrel RW (1978). Mechanism of oxyhemoglobin breakdown on reaction with acetyl phenyl hydrazine. *Biochem. J.* 173: 19-26.
- Ghalehkandi JG, Ebrahimnezhad Y, Sis N M (2013). The effect of aqueous garlic extract and chromium chloride complement on tissue anti oxidant system of male rats. *J. Anim. Plant Sci.* 23(1):56-59.
- Goel A, Dani V, Dhawan DK (2005). Protective effects of zinc on lipid peroxidation, antioxidant enzymes and hepatic histoarchitecture in chlorpyrifos-induced toxicity. *Chem. Biol. Interact.* 156:131-140.
- Gokalp O, Gulle K, Sulak O, Cicek E, Altuntas I (2003). The effects of methidathion on liver: role of vitamins E and C. *Toxicol. Ind. Health.* 19:63-67.
- Guney M, Demirin H, Oral B, Özgüner M, Bayhan G, Altuntas I (2007a). Ovarian toxicity in rats caused by methidathion and ameliorating effect of vitamins E and C. *Hum. Exp. Toxicol.* 26:491-498.
- Guney M, Oral B, Demirin H, Take G, Giray SG, Altuntas I, Mungan T (2007b). Fallopian damage induced by organophosphate insecticide methyl parathion, and protective effect of vitamins E and C on ultrastructural changes in rats. *Toxicol. Ind. Health.* 23:429-438.
- Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB (1974). Glutathione-S-transferase the first step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249: 7130-9.
- Halliwell B (1994). Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutr. Rev.* 52: 253-267.
- Halliwell B, Gutteridge JMC (2002). *Free radicals in biology and medicine.* Press Inc, Oxford 3, pp 105-245.
- Heikal TM, EL-Sherbiny M, Hassan SA, Arafa A, Ghanem HZ (2012). Antioxidant effect of selenium on hepatotoxicity induced by chlorpyrifos in male rats. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 4(20): 0975-1491.
- Hould R (1984). *Techniques d'histopathologie et de cytopathologie.* Ed Maloine. pp. 19-21:225-227.
- House WA, Welch AM (2014). Bioavailability of and Interactions between Zinc and Selenium in Rats Fed Wheat Grain Intrinsically Labeled with ⁶⁵Zn and ⁷⁵Se. *J Nutr. Min. Trace. Elem.* pp. 916-921.
- Jollow DJ, Michell JR, Zampaglionic, Gillete JR (1974). Bromobenzene-induced Liver necrosis: Protective role of glutathione and evidence for 3, 4-Bromobenzene oxide as hepatotoxic metabolite. *Pharmacol.* 11:151-169.
- Kalender S, Kalender Y, Durak D, Ogutcu A, Uzunhisarcikli M, Cevrimli BS, Yildirim M (2007). Methyl parathion induced nephrotoxicity in male rats and protective role of vitamins C and E. *Pest. Biochem. Physiol.* 88:213-218.
- Kalender S, Uzun GF, Durak D, Demir F, Kalender K (2010). Malathion-induced hepatotoxicity in rats: The effects of vitamins C and E. *Pest. Biochem. Physiol.* 48:633-638.
- Klaassen CD, Watkin JB (1984). Mechanism of formation, hepatic uptake and biliary excretion. *Pharmacol. Rev.* 36:1-67.
- Kralj KN, Gorup M (2004). Histochemical investigations of NADPH and NADH-Tetrazolium reductase activity in the liver of selenium and copper treated carp (*Ciprinus carpio* L.). *Vetirinarski. Arhiv.* 74(5):331-340.
- Lauwerys R, Lisson D (2007). *Toxicologie industrielle et intoxication professionnelle.* Elsevier Masson. Paris. pp. 1055-1057.
- Mansour SA, Mossa ATH (2009). Lipid peroxidation and oxidative stress in rat erythrocytes induced by chlorpyrifos and the protective effect of zinc. *Pest. Biochem. Physiol.* 93:34-39.
- Mazumder G (2005). Effect of chronic intake of arsenic contaminated water on liver. *Toxicol. App. Pharmacol.* 206(2):169-175.
- Messarah M, Amamra W, Boumendjel A, Barkat L, Bouasla I, Abdennour C, Boulakoud MS, El-Feki A (2012). Ameliorating effects of curcumin and vitamin E on diazinon induced oxidative damage in rat liver and erythrocytes. *Toxicol. Ind. Health.* 29(1):77-88.
- Movafagh A, Maleki F, Zadeh MSG, Fada S (2005). Association of glutathion S-transferase and chromosomal aberrations as a means to determine occupational exposure. *Int. Cong. Ser.* 1276: 197- 198.
- Nowak G (2000). Zinc neurotransmission and the mechanism of antidepressant action, in: Centeno J.A and Coltery. P (Eds), *Metal ions in biology and medicine.* Eurotext, Paris, pp 437-439.
- Ogutcu A, Suludere Z, Kalender Y (2008). Dichlorvos-induced hepatotoxicity in rats and the protective effects of vitamins C and E. *Env. Toxicol. Pharmacol.* 26:355-361.
- Ojezele MO, Abatan OM (2009). Toxicological effects of chlorpyrifos and methidathion in young chickens. *Afr. J. Biochem. Res.* 3:048-051.
- Prasad AS (2008). Clinical, immunological, anti-inflammatory and antioxidant roles of zinc. *Exp. Gerontol.* 43:370-377.
- Rayman M (2002). The argument for increasing selenium intake. *Proc. Nutr. Soc.* 61: 203-215.
- Rifkind JM, Nagababu E (2013). Hemoglobin redox reactions and red blood cell aging. *Antioxid. Redox. Signal.* 18(17):2274-2283.
- Savarino L, Granchi D, Ciapetti G, Cenni E, Ravaglia G, Forti P, Maioli F, Mattioli R (2001). Serum concentrations of zinc and selenium in elderly people: results in healthy nonagenarians/ centenarians. *Exp. Geront.* 36(2):327-339.
- Sefi M, Bouaziz H, Soudani N, Boudawara T, Zeghal N (2011). Fenthion induced-oxidative stress in the liver of adult rats and their progeny: Alleviation by *Artemisia campestris*. *Biochem. Physiol.* 101(2): 71-79.
- Sfar S, Jawed A, Amor S, Laporte F, Kerkeni A (2009). zinc, copper and antioxidant enzyme activities in healthy elderly Tunisian subjects. *Exper. Geront.* 44 (12): 812-817.
- Shankar AH, Prasad AS (1998). Zinc and immune function: the biological basis of altered resistance to infection. *Am. J. Clin. Nutr.* 68(2): 447-463.
- Sulak O, Altuntas I, Karahan N, Yildirim B, Akturk O, Yilmaz HR, Delibas N (2005). Nephrotoxicity in rats induced by organophosphate insecticide methidathion and ameliorating effects of vitamins E and C. *Pestic. Biochem. Physiol.* 83:21-28.
- Sutcu R, Altuntas I, Yildirim B, Karahan N, Demirin H, Delibas N (2006). The effects of subchronic methidathion toxicity on rat liver: Role of antioxidant vitamins C and E. *Cell. Biol. Toxicol.* 22: 221-227.
- Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact.* 160:1-40.
- Yavuz T, Altuntas I, Delibas I, Yildirim B, Caindir O, Coral A, Karahan N, Ibrisim E, Kutsal A (2004). Cardiotoxicity in rats induced by methidathion and ameliorating effect of vitamins E and C. *Hum. Exp. Toxicol.* 23:323-329.



Artemisia campestris Leaf Aqueous Extract Alleviates Methidathion-Induced Nephrotoxicity in Rats

Leila Barkat^{1,2}, Amel Boumendjel¹, Mongi Saoudi³, Abdelfattah El Feki³, Mahfoud Messarah^{1*}

¹Laboratory of Biochemistry and Environmental Toxicology, Faculty of Sciences, University of Badji Mokhtar, BP 12 Sidi Amar, Annaba, Algeria.

²Applied Biochemistry and Microbiology Laboratory, Faculty of Sciences, University of Badji Mokhtar, BP 12 Sidi Amar, Annaba, Algeria.

³Animal Ecophysiology Laboratory, Faculty of Sciences, Sfax, Soukra road – Km 3.5, BP 802, Sfax, Tunisia.

* Corresponding author's E-mail: mmessarahdz@yahoo.fr

Accepted on: 24-04-2015; Finalized on: 31-05-2015.

ABSTRACT

Methidathion (MD) is an organophosphate insecticide and acaricide used in both agricultural and urban areas throughout the world including Algeria. The objective of this study was to evaluate the protective effect of *Artemisia campestris* (Ac) leaf aqueous extract on sub-acute four-week's oxidative damage induced by MD on the hematological system and renal integrity of rats. The animals were randomly divided into four groups of seven each: group I served as control which received standard diet; group II received only Ac (5g/l) while the third group received only MD (5mg/kg b.w. by gavage using corn oil as vehicle). Rats in the fourth group (MD+Ac) were treated with MD and Ac extract. Results showed that lipid peroxidation increased significantly in MD-treated rats, as evidenced by high renal malondialdehyde (MDA) levels. As well as, the activities of glutathione peroxidase (GPx), superoxide dismutase (SOD) and glutathion-S-transferase (GST), catalase (CAT), and the level of reduced glutathione (GSH) content in renal tissue decreased by MD. On the other hand, a significant increase in plasmatic levels of total protein, urea and creatinine levels was observed in MD-treated group. However, the treatment of Ac extract with MD-treated rats has maintained the biochemical parameters cited above. The changes in hematological and biochemical parameters were substantiated by histological data. In conclusion, our results indicated a possible mechanism of MD-induced nephrotoxicity and plasma biomarkers were disturbed. *Artemisia campestris* leaf aqueous extract ameliorated the toxic effects of this pesticide in renal tissue suggesting their role as potential antioxidants.

Keywords: Methidathion, *Artemisia campestris*, Biochemical studies, Kidney, Oxidative stress, Rat.

INTRODUCTION

The widespread use of pesticides around the world in large amount, specifically in public health and agricultural programs has caused environmental pollution and led to a variety of negative effects in human health. Organophosphate insecticides (OPIs) represent one of the major classes of insecticides in use since the mid 1940s¹. Commonly OPIs are used for their relative low toxicity and their low persistence in mammalian system². Furthermore, the major acute mammalian toxicity associated with exposure to OPIs results from the irreversible inhibition of acetyl cholinesterase enzyme^{3,4}, which cause accumulation of acetylcholine at cholinergic synapses resulting in muscarinic and nicotinic syndromes⁴. Chronic and subchronic exposure of OPIs may induce oxidative stress leading to generation of free radicals and alteration in antioxidants or reactive oxygen species (ROS) scavenging enzymes in the target tissue⁵. This led an imbalance between antioxidant system and pro-oxidant state generated by OPIs. In addition, the cells have various mechanisms to repair oxidative stress by enzymatic antioxidant comprising, superoxide dismutase (SOD), Catalase (CAT), Glutathion peroxidase (GPx), or non enzymatic systems by the action of reduced glutathione (GSH), and glutathione-S-transferase (GST)⁶.

Methidathion (MD) S-[(2, 3-dihydro-5-methoxy-2-oxo-1,3,4-thiadiazol 3(2H)-yl) methyl] O,O dimethyl phosphorodithioate, is one of the most important OPIs

used worldwide in the pest control of crops⁷. It has been reported that the major route of the metabolism of methidathion in rat liver was through glutathion-S-transferase and the predominant metabolite was desmethyl methidathion⁸. In addition, the sub chronic administration of MD may induce biochemical and histopathological changes in different tissues such as liver, kidney and heart. However, the supplementation of antioxidants can be useful to inhibit oxidative damage⁷.

Recently, it has been reported to find natural antioxidant in plant materials which play a significant function in protecting living organisms from the toxic effect of pesticides⁹. Moreover, plants often contain substantial amounts of antioxidants including alpha tocopherol, carotenoids; ascorbic acid, flavonoids and tannins¹⁰. In this context, *Artemisia campestris* (Ac) represent a perennial scarcely aromatic herb belonging to *Asteraceae* family, and it is used against a variety of diseases in Northern Africa^{11,12}.

The leaves of this plant collected in summer (july-august 2012) from Tebessa (Eastern Algerian) commonly called in Algerian folk medicine (T gouft). Several recent studies revealed after extraction of *A. campestris* (aqueous or ethanol) different pharmacological activities such as, antioxidants, insecticidal, antimicrobial, antirheumatic and relaxation¹¹⁻¹⁴. In fact, Ac extract was reported to be a potent free radical scavenger of 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrozyl (DPPH), hydroxyl and superoxide anion radicals¹⁵. Recently, Ghorab¹⁴ have found the main



essential oil of hydrodistilled fresh aerial parts of *Ac* which exhibited the best antibacterial activity against *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*. Furthermore, the recent study of Akrou¹¹ reported that the essential oils extracted from *Ac* (100µg/ml) ethanol-water (50%) and infusion (5g/100ml) can inhibit the human adenocarcinoma cell growth. In addition, Sefi¹² suggested that *Ac* leaf extract (200mg/kg) can prevent diabetic nephropathy by attenuating oxidative and nitroactive stress.

Behind liver, the kidneys are the most sensitive organ against pesticide and toxicity damage, as they play a key role in the metabolism and elimination of xenociotics¹⁶. To our knowledge, there are no previous data about the nephroprotective effect of *Ac* against MD toxicity. For this reason, the present study was undertaken to examine the role of an aqueous extract (5g/l) of *Ac* against MD toxicity in kidney of male rats. Accordingly, the antioxidants status of kidney was determined by measuring the activity of glutathion-s-transferase (GST), glutathione peroxidase (GPx), superoxide dismutase (SOD), and catalase (CAT), as well as the level of reduced glutathione GSH, and MDA. In addition, Urea and creatinine level were also estimated.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals and Reagents

Methidathion is an organophosphate insecticide and acaridae (Figure 1). CAS chemical name is (S-2, 3-dihydro-5-methoxy-2-oxo-1, 3, 4-thiadiazol-3-ylmethyl O, O-dimethyl phosphorodithioate); CAS registry number is 950-37-8. A commercial formulation of MD, named 'Supracide®' was used in the experiments. All other chemical products used in this study were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, France).

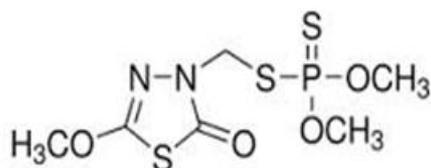


Figure 1: Chemical structure of Methidathion

Plant

Preparation of *A. campestris* Extract

Areal parts of *A. campestris* were collected in summer (2012) from Tebessa (Eastern Algerian). Samples were air dried during 20 days in the laboratory at ambient temperature (20-25°). After that the samples were ground, washed and put in boiling water (5g/l) for 15-20min. The aqueous extracts were filtrated using Whatmann filter paper and directly used for experiment. The extract should be prepared daily at the moment of experiment.

Determination of Total Phenolic Content

The concentration of total phenolic in the extract was determined with Folin-Ciocalteu reagent and external calibration with gallic acid, using the method of Chen.¹⁷ Briefly, 100 µl of diluted sample was shaken for 5 min with 750 µl of diluted Folin-Ciocalteu reagent (x10). Then, 750 µl of 20% Na₂CO₃ was added. The final mixture was shaken and then incubated at room for 90 min. The absorbance was measured at 750 nm with UV-VIS Bueco S-22 spectrophotometer. Gallic acid was used to prepare a standard curve (0.05–0.5 mg/ml, $y=0.011x+0.04$, $R^2=0.987$, where y is the absorbance and x is the standard concentration). The phenolic content was expressed as milligram gallic acid equivalent per gram extract (mg GAE/g extract).

Determination of Total Flavonoids Content

The total flavonoid content in the extract was determined according to Djeridane¹⁸, using the method based on the formation of a complex flavonoid-aluminium. About 1 ml of diluted sample was mixed with 1 ml of 2% aluminium trichloride (AlCl₃) methanolic solution. After incubation at room temperature for 15 min, the absorbance of the reaction mixture was measured at 430 nm with UV-VIS Bueco S-22 spectrophotometer. Quercetin was used for standard curve construction (0.05–0.5 mg/ml, $y=0.036x+0.275$, $R^2=0.97$, where y is the absorbance and x is the standard concentration). The results were expressed as milligram quercetin equivalents (QE)/g extract.

Determination of Total Tannin Content

The method of Julkunen-Tiitto¹⁹ was followed in this assay. An aliquot (50 µl) of diluted sample or standard solution was mixed with 3 ml of 4 % vanillin (prepared with methanol), then 100 µl of HCl were added. The well-mixed solution was incubated in the dark at ambient temperature for 20 min. The absorbance against blank was read at 500 nm. Catechin was used to make the standard curve (0.05–0.5 mg/ml, $y=0.002x+0.006$, $R^2=0.98$, where y is the absorbance and x is the standard concentration). The results were expressed as milligram catechin equivalents (CE/g extract).

Antioxidant Activity

DPPH Essay

Scavenging activity against the diphenyl-picrylhydrazyl (DPPH) radical was determined by Blois²⁰ with some modifications. Various dilutions of samples were mixed with ethanolic DPPH solution. After an incubation period of 30 min at 25°C, the absorbance against blank was read at 520 nm with UV-VIS Bueco S-22 spectrophotometer. The free radical scavenging of each solution was then calculated as follows:

$$\% \text{ Inhibition} = 100 \left(\frac{A_{\text{Blanc}} - S_{\text{Sample}}}{A_{\text{Blanc}}} \right)$$

The antioxidant activities of Ac were expressed as IC₅₀, defined as the concentration of the test material required to cause a 50 % decrease in initial DPPH concentration.

ABTS Essay

ABTS radical scavenging assay was conducted according to the method reported by Re²¹. The assay is based on ABTS radicals, which are generated by the reaction of 9.5 mL ABTS solution (7 mmol/L) with 245 µL potassium persulfate (100 mmol/L). The volume was then made up to 10 mL with distilled water. The solution was kept in dark at room temperature for 18 h prior to use. After that, the solution was diluted with 0.1 mol/L potassium phosphate buffer so as to obtain an absorbance of 0.70 ± 0.02 at 745 nm at 30 °C. For the assay, 10 µL plant extract/fraction (0.5 mg/mL) was mixed with 2.99 mL ABTS radical solution. The absorbance was measured at 734 nm after 10 min.

Animals and Treatment

Twenty eight male Wistar rats (weighing 270–290g) were obtained from the Pasteur institute (Algiers, Algeria). Animals were acclimated for 1 week under the same laboratory conditions of photoperiod (12-h light: 12-h dark cycle), a minimum relative humidity of 40% and room temperature 24±2°C. Food (standard diet, supplied by the "ONAB, El-Harrouch", Algeria) and water were available *ad libitum*. The rats were randomly divided into four groups of seven individuals each as follows. The first group of rats served as the control; the second group (Ac) received via drinking an aqueous extract of Ac at the dose of 5g/ml. While the third group (MD) was administered at a dose of 5mg/kg b.w. by gavage using corn oil as vehicle. Rats in the fourth group (MD + Ac) were treated with MD plus an aqueous extract of *A. campestris* at the dose of 5g/l. Only corn oil was given in the same way to the control group. The dose of MD used in this study represents 1/15 of LD₅₀ (5mg/kg bw) which has been used previously by other investigators since it is toxic but not lethal to rats^{7,22}.

The Ac dose (5mg/kg b.w.) used in our experiment and in other findings gave high protection against stress conditions in several tissues^{23,6,12}. Rats were administered their respective doses every day for four weeks. The experimental procedures were carried out according to the National Institute of Health Guidelines for Animal Care and approved by the Ethics Committee of our Institution.

The amount of ingested diet was calculated as the difference between the weight of feed that remained in the food bin (D₁) and the amount placed 1 day before (D₂). These data were then used to calculate the daily average feed intake, according to the formula:

$$\text{Average feed intake: } D_2 - D_1$$

At the end of the experiment, body weights of rats were recorded. Animals were sacrificed by cervical decapitation without anesthesia to avoid animal stress. Kidneys,

removed from adipose tissue and adrenal glands, were taken and their absolute and relative weights were recorded. Blood samples were collected in EDTA tubes and centrifuged at 2200g for 15 min at 4°C. Plasma samples were stored at -20°C until biochemical analysis of total protein, creatinine and urea contents.

Hematological Variables

Red blood cells (RBCs) count, hemoglobin (Hb) concentration, hematocrit, mean corpuscular volume, mean corpuscular Hb and mean corpuscular Hb concentration were measured by electronic automate coulter MAXM (Beckman Coulter, Inc., Fullerton, California, USA).

Tissue preparation

Kidneys removed from control and tested rat were homogenized in 2 ml of buffer solution of phosphate buffered saline 1:2 (w/v; 1g tissue with 2ml PBS, pH 7.4). Homogenates were centrifuged at 10.000g for 15 min at 4°C, and the resultant supernatant was used for the determination of malondialdehyde (MDA) and reduced glutathione (GSH) levels in the hand, and measuring the activity of GPX, CAT, SOD and GST in the other hand.

Estimation Renal Plasma Biomarkers

Plasma protein, creatinine, urea levels were assayed using commercial reagent kits (Spinreact Spain Ref: 41010, 1001110 and 1001332 respectively).

Estimation of Lipid Peroxidation

Lipid peroxidation level in kidney homogenate was estimated by measuring thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and was expressed in terms of malondialdehyde (MDA) content which is the end product of lipid peroxidation, according to Buege and Aust (1984)²⁴. 125µl of supernatants were homogenized by sonication with 50µl of PBS, 125µl of TCA-BHT (trichloroacetic acid- butylhydroxytoluene) in order to precipitate proteins and then centrifuged (1000g, 10min, and 4°C). 200µl of supernatant were mixed with 40µl of HCl (0.6 M) and 160µl of TBA dissolved in Tris, and the mixture was heated at 80°C for 10min. The absorbance of the resultant supernatant was read at 530nm. The amount of MDA was calculated using a molar extinction coefficient of 1.56×10⁵ M/cm.

Estimation of Reduced Glutathione

Kidney GSH content was estimated using a colorimetric technique, as mentioned by Ellman (1959)²⁵ modified by Jollow²⁶, based on the development of a yellow colour when DTNB [(5,5 dithiobis-(2-nitrobenzoic acid))] is added to compounds containing sulfhydryl groups. In brief, 0.8ml of liver supernatant was added to 0.3ml of 0.25% sulphosalicylic acid and tubes were centrifuged at 2500g for 15min. Supernatant was mixed with 0.01 M DTNB and phosphate buffer (0.1M, pH 7.4). Finally, absorbance at 412nm was recorded. Total GSH content was expressed as nmol GSH/mg protein.



Estimation of Glutathione-S-transferase Activity

Glutathione-S-transferase (GST) (EC 2.5.1.18) catalyzes the conjugation reaction with glutathione in the first step of mercapturic acid synthesis. The activity of GST was measured according to the method of Habig²⁷. P-nitrobenzylchloride was used as substrate. The absorbance was measured spectrophotometrically at 340nm at 30s intervals for 3 min.

Measurement of Antioxidant Enzyme Activities

Measurement of Glutathione Peroxidase Activity

Glutathione peroxidase (GPx) (*E.C.1.11.1.9*) activity was measured by the procedure of Flohe and Gunzler (1984)²⁸.

Supernatant obtained after centrifuging 5% kidney homogenate at 1500g for 10 min followed by 10000g for 30 min at 4°C was used for GPx assay. One ml of reaction mixture was prepared which contained 0.3 ml of phosphate buffer (0.1M, pH 7.4), 0.2ml of GSH (2mM), 0.1 ml of sodium azide (10mM), 0.1 ml of H₂O₂ (1mM) and 0.3 ml of liver supernatant. After incubation at 37°C for 15 min, reaction was terminated by addition of 0.5 ml 5% TCA. Tubes were centrifuged at 1500g for 5 min and the supernatant was collected. 0.2 ml of phosphate buffer (0.1M pH7.4) and 0.7 ml of DTNB (0.4 mg/ml) were added to 0.1 ml of reaction supernatant.

After mixing, absorbance was recorded at 420 nm.

Measurement of Catalase Activity

The catalase (*E.C.1.11.1.6*) activity was measured according to Aebi (1974)²⁹. Assay is based on the ability of the enzyme to induce the disappearance of hydrogen peroxide. The reaction mixture consist of 780µl phosphate buffer (pH 7.5), 200µl of hydrogen peroxide (500mM) and 200µl supernatant in a final volume of 1ml. Absorbance was recorded at 240 nm every 15 second for 1min. The enzyme activity was calculated by using an extinction coefficient of 0.043mM cm⁻¹.

Measurement of Superoxide Dismutase Activity

The method of the determination of SOD (*E.C.1.15.11*) activity by the NBT test is a method of photo reduction of riboflavin/methionine complex that generates superoxide anion. The oxidation of the NBT by the anion superoxide O₂⁻ is used as the basis for the presence of SOD detection. In aerobic environments the riboflavin, methionine, and NBT mixture gives a blue color. The presence of SOD inhibited the oxidation of the NBT. SOD activity was estimated by Beauchamp and Fridovich (1971)³⁰. Procedure, briefly, 5µl of the supernatant was combined with 1ml of EDTA/methionine (0.3mM), 1890 ml phosphate buffer (pH 7.8), 85µl of 2.6mM NBT and 22µl of riboflavin (0.26mM) was added as the last and switching on the light.

The reaction changes in absorbance at 560nm were recorded after 20min.

Measurement of Protein Content

The protein contents of various samples were determined by the method of Bradford (1976)³¹ using bovine serum albumin as a standard.

Histopathological Analysis

For histopathological analysis, the kidneys tissues were dissected and the tissue samples were immediately fixed in formalin solution, embedded in paraffin.

The paraffin sections were cut into 5µm thick slices and stained with hematoxylin and eosin (H&E)³² or light microscopic examination. The sections were viewed and photographed.

Statistical Analysis

Data are expressed as means ± SEM. Data comparisons were carried out by using one way analysis of variance followed by Student's t-test to compare means between the different treatment groups. Differences were considered statistically significant at p ≤ 0.05.

RESULTS

Polyphenol, Flavonoids and Tannin Content of Infusion Extract

The total phenolic content of an infusion extract of *Artemisia campestris* was 16.88 mg of GAE/100 g of extract as also shown in Table 1. The total flavonoid content was expressed as 1.9 mg of quercetin equivalents per gram of Ac. Besides, the results showed that Ac Infusion contained 426.5 mg of condensed tannins, which expressed as milligrams of catechin equivalents per gram.

Antioxidant Activity of Artemisia Campestris

The results of the determination of the antioxidant activity of Ac extract using two methods (DPPH, ABTS) are presented in Table 1.

The assessment of antioxidant activity (DPPH) showed an IC₅₀ value of 74.62% (Table 1). However, the IC₅₀ value of Ac on ABTS radical-scavenging activity was 26.01 %.

Table 1: Amounts of antiradicalar DPPH, antiradicalar ABTS, total phenols content, total flavonoids and condensed tannins in infusion extract of *Artemisia campestris*.

50 % scavenging concentration (mg/ml) on DPPH radical	74.62 ± 5.81
50 % scavenging concentration (mg/ml) on ABTS radical	26.01 ± 5.74
Total phenolic content (mg GAE/g of Ac)	16.88 ± 0.01
Total flavonoid content (mg QE/g Ac)	1.90 ± 0.108
Condensed tannins (mg CE/g Ac)	426.5 ± 0.128

GAE gallique acid equivalents; QE quercetin equivalents; CE catechin equivalents



Effects of Treatment on General Rat Health

In our study, there were no deaths in any of the groups.

While more severe fatigue symptoms were observed in MD group compared to control group.

However, fatigue symptoms were less severe in MD+Ac group as compared to control group.

As shown in (Table 2), the decrease in body weight of MD group was associated with the reduction in food intake by 21%.

Beside, the administration of Ac extract with MD showed an improvement of the consumption in food intake by 28.49% as compared to the MD-treated group.

Effects of Treatments on Body and Kidney Weights

The variations in the body and relative kidney weights of male rats in control and treatment groups are given in (Table 2). During the course of present work, it was observed that the body weights of control and Ac extract treated group, increased progressively throughout the study. However, the exposure of MD resulted in the loss of body weight of the rats by 15%. Treatment with Ac extract resulted an improvement in the body weight of the MD-treated rats by 8% as compared to the control one. Furthermore, a significant increase of MD-treated rats in absolute and relative kidney weights was recorded (12% and 11% respectively) as compared to the case of controls, and by 12.16% and 10.9% respectively as compared to the MD-treated group.

Table 2: Effects of methidathion (MD), Artemisia campestris (Ac) and their combination (MD+Ac) on body weight (g), relative and absolute kidney weights and daily food intake in rats after 4-week treatment.

Parameters Studied	Treatment Groups			
	Control	Ac	MD	MD+Ac
Initial body weight (g)	315.63 ± 31.90	323.63 ± 45.40	316 ± 38.97	308.5 ± 28.14
Final body weight (g)	347.50 ± 58.62	337.63 ± 45.70	296.6 ± 38.94 [*]	321.8 ± 28.20
Absolute kidney weight (g)	1.90 ± 0.13	1.90 ± 0.22	2.12 ± 0.30 [*]	1.9 ± 0.20
Relative kidney weight ^a	0.63 ± 0.04	0.62 ± 0.10	0.71 ± 0.10 [*]	0.64 ± 0.10
Food intake ^b	22.45 ± 3.29	22.93 ± 1.87	17.83 ± 1.67 [*]	22.91 ± 1.25 [#]

^a Absolute kidney weight measured as gram per 100 gram body weight (g/100 g b.w.); ^b Food intake measured as gram per day per rat (g/day/rat); Values are given as mean ± SEM for group of 7 animals each.; * MD and MD+Ac groups compared with control group (*p<0.05; **p<0.01); # MD+Ac group compared with MD group (#p<0.05)

Table 3: Effects of methidathion (MD), Artemisia campestris (Ac) and their combination (MD+Ac) on hematological parameters in rats after 4-week treatment.

Parameters Studied	Treatment Groups			
	Control	Ac	MD	MD+Ac
RBCx 10 ⁶ mm ³	6.74 ± 0.60	5.60 ± 0.70	4.10 ± 0.60 ^{**}	5.42 ± 1.20
WBCx10 ⁶ mm ³	4.61 ± 1.01	5.90 ± 1.30	4.83 ± 1.83	4.9 ± 1.61
Hb (g/dl)	9.50 ± 1.30	9.73 ± 1.10	8.70 ± 2.14 [*]	9.34 ± 1.99
Plt (10 ³ /mm ³)	355.10 ± 32.23	422.65 ± 25.74	298.32 ± 19.45 [*]	389.95 ± 27.84
Ht (%)	25.21 ± 5.02	28.20 ± 3.60	28.6 ± 7.50	26.00 ± 7.20
VMC(μ ³)	50.04 ± 1.10	50.50 ± 0.90	50.50 ± 0.80	50.63 ± 1.62
TCMH(pg)	16.80 ± 0.40	18.00 ± 0.33	17.20 ± 0.20	17.20 ± 0.60 ^{**}
CCMH (%)	34.53 ± 0.50	35.60 ± 0.60	34.03 ± 0.30	33.80 ± 0.42

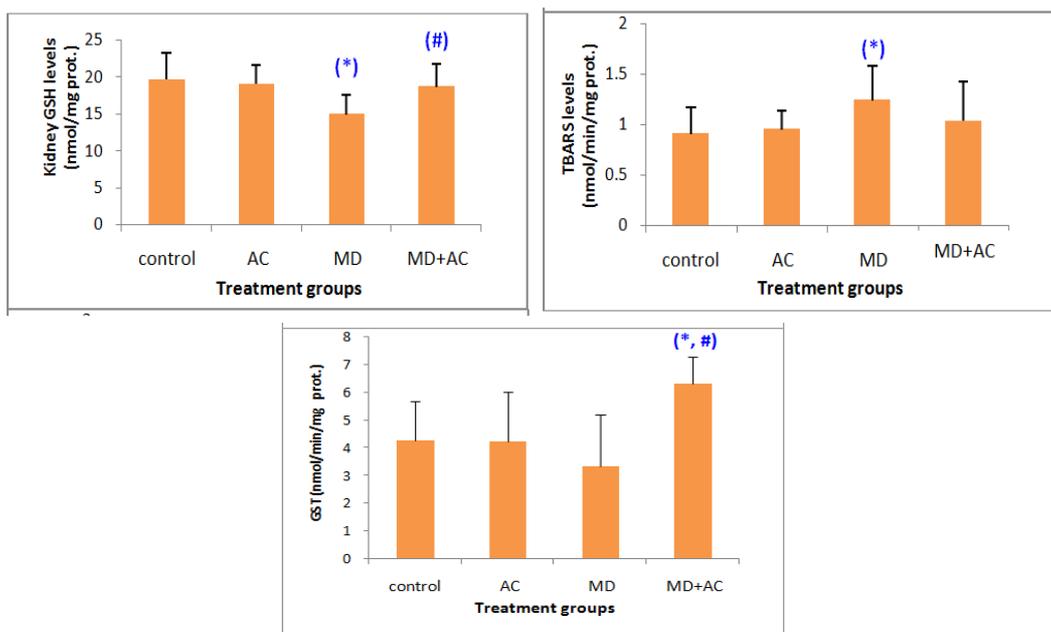
Values are given as mean ± SEM for group of 7 animals each.; * MD and MD+Ac groups compared with control group (*p<0.05; **p<0.01); # MD+Ac group compared with MD group (#p<0.05)

Table 4: Effects of methidathion (MD), Artemisia campestris (Ac) and their combination (MD+Ac) on serum biochemical parameters, antioxidant enzyme activities in kidneys of control and treated rats after 4-week treatment.

Parameters Studied	Treatment Group			
	Control	Ac	MD	MD+Ac
Total protein (mg)	66.69 ± 4.50	67.72 ± 2.30	78.44 ± 6.33 ^{**}	70.95 ± 5.60 [#]
Urea (mmol/l)	6.27 ± 0.54	6.31 ± 0.73	7.12 ± 0.48 ^{**}	6.32 ± 0.70 [#]
Creatinine (mmol/l)	34.13 ± 5.70	35.38 ± 6.60	40.50 ± 6.74 [*]	39.60 ± 3.30
Glutathione peroxidase ^a	9.89 ± 0.21	10.72 ± 0.26	6.94 ± 0.16 [*]	10.91 ± 0.65
Superoxyde dismutase ^b	2.69 ± 0.07	0.88 ± 0.04	1.43 ± 0.05 ^{**}	2.08 ± 0.03 [*]
Catalase ^c	2.53 ± 0.01	1.69 ± 0.07	0.93 ± 0.01 [*]	2.19 ± 0.05 ^{***}

^a Glutathione peroxidase: nmoles of GSH/ min/mg protein; ^b Superoxyde dismutase : units represents the amount of enzyme that inhibits the oxidation of NBT by 50%/mg de protein.; ^c Catalase: μmoles H₂O₂ degraded/ min/mg protein; Values are given as mean ± SEM for group of 7 animals each.; * MD and MD+Ac groups compared with control group (*p<0.05); # D+Ac group compared with MD group (#p<0.05)





Values are given as mean ± SEM for group of 7 animals each. * MD; MD+Ac groups versus control group (* p≤0.05). # MD+Ac group versus MD group (# p≤0.05).

Figure 2: Reduced glutathione (nmol/mg protein), TBARS (nmol MDA/mg protein) levels and Enzyme activity of GST (nmol/min/mg prot) in kidney of control and rats treated with methidathion (MD), Artemisia campestris (Ac) and their combination (MD+Ac) after 4-weeks of treatment.

Table 6: Semiquantitative scoring of architectural damage on histopathological examination of the rat kidneys in the different treatment groups.

Parameters Studied	Treatment groups			
	Control	Ac	MD	MD+Ac
Tubular dilatation	-	-	++	-
Hemorrhage	-	-	+++	++
Necrosis in epithelial cells of the proximal tubules	-	-	+++	-
Leucocyte infiltration	-	-	+++	-
Glomerular sclerosis	-	-	++	-

(-) indicates normal, (+) indicates mild, (++) indicates moderate, (+++) indicates severe, and (+++++) indicates extremely severe.

Effects of Treatments on Hematological Parameters

As shown in (Table 3), hematological parameters in control and treated groups. Red blood cells (RBCs), haemoglobin (Hb) content in MD-treated group were significantly decreased compared to those in the controls. While, administration of Ac extract with MD showed an improvement of RBCs and Hb levels by 32.8% and 8% respectively as compared to the MD-treated group.

Effects of Treatments on Plasma Biochemical Parameters

Biochemical parameters were investigated to assess the effects of MD on renal functions and to determine whether Ac extract could ameliorate the damage induced by this compound, so total protein, creatinine and urea are indicators of renal function. As shown in (Table 4) compared to the control group, the MD-treated group

had significantly higher total protein, creatinine, and urea levels. However, the administration of Ac extracts to MD-treated group was significantly reversed these change to near normal values.

Effects of Treatments on Renal Oxidative Stress Parameters

Table 4; Figure 2 summarizes the changes of kidney oxidative injury. To explore the oxidative consequences of methidathion treatment in kidney and to determine the possible protective effects of Ac extract, we analyzed the formation of TBARS which showed a significant increase (36.26%) in MDA level compared to the control group. Conversely, Exposure to Ac extract in rats prevented the TBARS production induced by MD. A significant decrease of SOD (-47%), GSH-Px (-30.5%), GST (-22.01%), and CAT (-63%) activities was found in Kidney of MD-Treated animals compared to control. These changes were



accompanied by a significant decrease (- 24%) in GSH content. On the other hand, the administration of Ac extract with MD produced recovery in the above mentioned renal oxidative stress parameters.

Histopathological Changes in the Kidneys

The hispathological alterations in kidney observed under light microscopy in methidathion treated rats were objectified by tubular dilatation, hemorrhage, glomerular sclerosis, leukocyte infiltration, and necrosis in epithelial cells of the proximal tubules (Figure 3C-F). In fact, there were no histological changes in the kidney of a positive group treated only with Ac extract (Figure 3B) when compared with a control group (Figure 3A). Whereas, in MD+Ac group kidney injury was remarkably reduced in comparison to the MD treated group. The histopathological changes are graded and summarized in Table 6. Histological grading was made according to five severity grades: (-) indicates normal, (+) indicates mild, (++) indicates moderate, (+++) indicates severe, and (+++++) indicates extremely severe.

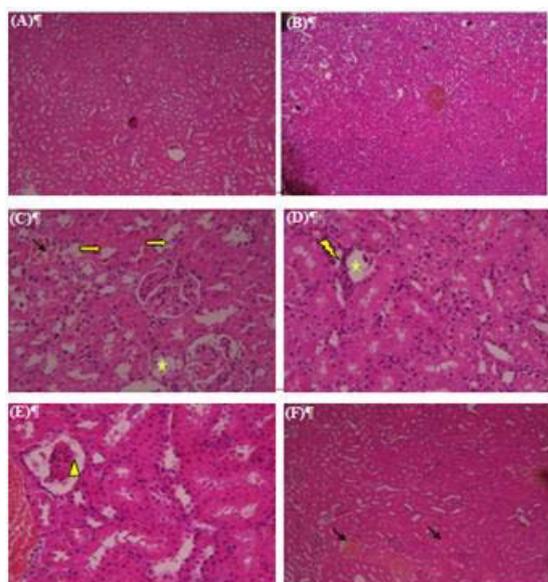


Figure 3: Effect of methidathion (MD) and *Artemisia campestris* (AC) administrated with MD on histopathological damages in the kidney. Controls (A), treated with AC (B), MD (C-D-E) and AC administrated with MD (F) after 4 weeks of treatment, as revealed by light microscopy.

Tubular dilatation (→), leukocyte infiltration (↘), necrosis in epithelial cells of the proximal tubules (★), hemorrhage (→), and glomerular sclerosis (Δ).

DISCUSSION

Oxidative stress is characterized by the imbalance between production of oxygen free radicals (OFRs) and antioxidants defenses in the body which may cause at the time chronic permanent damage³³. Furthermore, treatment of OPIs induced-oxidative stress with medicinal plants has proved to be much safer than synthetic drugs, and gained an importance in recent years¹². Medicinal plant contains a large variety of free radicals scavenging molecules such as vitamins, phenolic compounds,

flavonoids, and other endogenous metabolites rich in antioxidants activity³⁴. In the current study, Preliminary phytochemical analysis showed that phenols, flavonoids and condensed tannin existed in the infusion extract of *Artemisia campestris*. The stable DPPH radical is widely used to evaluate the free radical-scavenging activity in many plant extracts. The assessment of antioxidant activity showed that the infusion extract of Ac was able to scavenge this radical.

MD is widely used throughout the world as a wide-spectrum insecticide for numerous harmful agricultural crops. Although MD is well known to have general health effects little is known of how MD contributes to the oxidative stress on higher animals. Many studies suggest that MD could cause oxidative stress in liver, kidney and heart^{35,36}. In addition, OPIs cause a reduction of body weight in experimental animals^{22,37,38}. In the present study, oral administration of MD (5mg/kg b.w) resulted in significant reduction in body weight. This might probably attributed to the reduction of feed consumption and/or malabsorption of nutrients induced by MD effects on the gastro-intestinal tract and/or inhibition of protein synthesis. MD exposure may account to reduced food intake seen in the MD-treated group. Hence, these findings were similar to the results published by Ogutcu³⁸ and Messarah³⁹, who reported that OPs exposure have significantly induced disturbances of the total body weight. MD treatment resulted also in a significant increase in relative and absolute kidneys weights of rats. This may probably due, according to Kamath⁴⁰, and Mahjoubi-samet⁴¹, to oedema and inflammation.

In the current study, the exposure of rats to MD induced hematological changes (essentially RBC and Hb). Our results corroborated with the findings of Ojezele and Abatan⁴² who reported a reduction in RBC and Hb in MD-treated group, which can be attributed by intravascular haemolysis, anemia, or depression of the haemopoiesis. Paradoxaly, the kidneys are responsible for the production of erythropoietin, so the finding may be due to the dysfunction of kidney and inhibition in the syntheses of erythropoietin.

On the other hand, haemoglobin in erythrocytes, is a major source of radical production when it interacts with redox drugs or xenobiotics giving rise to superoxide radicals, hydrogen peroxide and in certain cases peroxy radicals leading to membrane lipid peroxidation and hemolysis⁴³. Similar results have been found in rat erythrocytes exposed to diazinon for 3 weeks³⁹. Prasanthi⁴⁴ reported that oxidative damage, induced by pesticides, might be due to their lipophilicity, whereby they could penetrate easily to the cell membrane and caused membrane lipid peroxidation.

The co-administration of Ac (5mg/kg bw) attenuated the *in vivo* effects of MD by scavenging or neutralizing reactive oxygen species (ROS). These results indicated that Ac might have a beneficial role in lowering OPIs toxicity probably due to its radical scavenging property.⁴⁵

The treatment of rats with Ac alone did not cause alterations in erythrocytes.

The kidney is the critical target organ for xenobiotic compounds which produce a variety of renal toxic effects involving tubular cells and glomerulus⁴⁶. In the other hand, urea and creatinine level represent the most sensitive markers of kidney damage and it is known that the elevated of may be correlated to an increase protein catabolism in mammals and/or the conversion of ammonia to urea blood urea⁴⁷. The increase in plasma urea and creatinine in MD-treated rats support these findings and suggest a reduction in glomerular filtration. The administration of Ac extract protects the kidney function from MD intoxication as indicated by significant restoration of urea and creatinine levels. These findings corroborated with previous studies investigated in adult's rats treated by dimethoate⁴¹.

The mentioned biochemical alterations are correlated with kidney histological changes. In fact, histological changes seen in the kidneys of rats are characterized by a glomerular sclerosis, and leucocyte infiltration which is in good accordance with previous study of Sulak³⁶ and Mahdjoubi samet⁴¹, who had found degenerative changes in kidney of adult rats exposed to methidathion and dimethoate respectively. Moreover, necrosis in epithelial cells of the proximal tubules and tubular dilatation were observed. This could be due to the accumulation of free radicals as the consequence of increased lipid peroxidation by cyanides and aldehydes in the renal tissues of MD-treated rats⁴⁷. Whereas, administration of oral Ac extract reduce degenerative damage of the kidneys, so, it protect the histological aspect of kidney which is confirmed by previous findings of Sefi¹².

To improve biochemical and histological changes, antioxidant play major role against harmful injuries⁶. GSH represent a major compound of defense against oxidative stress, so, its play a role as a cofactor with different antioxidant enzymes especially GPx⁴⁸. It is known that mammalian cells have a comprehensive set of antioxidants defense mechanism to prevent free radicals formation and to limit their damaging effect⁴⁹. In the present finding, the significant decrease in GSH levels promoted by MD leads to a significant decrease in the effectiveness of the antioxidant enzyme defense system sensitizing the cells to ROS³⁵. In fact, GSH is known to participate in the cellular defense system against oxidative stress by scavenging free radicals and reactive oxygen species intermediates⁵⁰. Thus, depletion of GSH levels may be due to their consumption in quenching free radicals probably generated by DM. Indeed, GSH is considered as the essential compound that maintains cell integrity due to its reducing properties and its participation in the cell metabolism³.

Co-administration of Ac after MD treatment improved GSH levels to reach normal values and ameliorated the antioxidant defense system. These data are similar to those reported in diabetic rats and suggested that Ac

increase the biosynthesis of GSH and reduce the oxidative stress leading to less degradation of GSH⁴⁵. Furthermore, administration of MD contribute to a significant decrease in GPx, SOD and CAT activities. Lowered activities of GPx, SOD and CAT may be due to excess production of O₂⁻, and H₂O₂ or the product of decomposition which therefore triggered deleterious reactions⁴¹. Similar results have been found in rat erythrocytes exposed to triazophos¹⁶ or lambda cyhalothrin⁴⁷. Our findings, confirm previous investigations of Mahdjoubi-samet⁴¹ and Sefi⁴⁵.

GST may play an important role in metabolism of xenobiotics substances especially in cellular detoxification of ionizing radiation in human⁵¹. A significant decrease of GST activity in rats treated with MD was observed. This could be explained according to Kostaropoulos⁵², by rapidly metabolizing the insecticide to nontoxic products, or by rapidly binding and very slowly turning over the insecticide. Such results are in a good accordance with those obtained by Larsen⁵³. In Ac extract treated group we found a significant higher in GST activity, it can due to the protective effect of Ac extract which stimulate the production of this enzyme.

ROS were a part of normal oxidative metabolism, when it produced in excess, they caused tissue injury including lipid peroxidation, protein and DNA damage⁵⁴. However, lipid peroxidation is a basic cellular deteriorating process induced by oxidative stress and occurs readily in the tissues rich in highly oxidizable polyunsaturated fatty acids⁵⁵. MDA, the end product of lipid peroxidation, has also been measured to indicate the presence of free radicals⁵⁶. Organophosphorus compounds cause increase of lipid peroxidation level^{56,41,36}. In the current study, the increased levels of MDA, the major product of lipid peroxidation, suggested that MD treatment induced significant oxidative stress in kidney tissue of rats. However, lipid peroxidation were scavenged by the Ac extract which are rich in flavonoids and polyphenols. Several studies have shown that these compounds (flavonoids and polyphenols) inhibited the formation of free radicals and propagation of free radical reactions through hydrogen-donation and aromatic hydroxylation^{55,57}.

The mechanism by which Ac extract induced its nephroprotective activity against oxidative damage of methidathion, is based on the phytochemical composition of this extract (essential oil, tannins, polyphenol, flavonoids, saponosids) which have the ability to detoxify free radicals H, OH, O₂, and to its capacity to inhibits lipid peroxidation in the kidney tissue.

Furthermore, the recent previous study of Saudi²³ showed after phytochemical tests on Ac extract infusion (5mg/ml) that the extract has a potential source of antioxidant. Moreover, it could take place as oxide radical scavenging activity and/or superoxide scavenging, as well as, our finding proved and support the antioxidant activity of Ac extract.



CONCLUSION

In conclusion, this study demonstrates that exposure to MD provoked nephrotoxicity by inducing lipid peroxidation and depletion in antioxidant enzyme activities of rats.

However, Ac extract treatment could protect kidney against MD toxicity by reducing MDA level and increasing the activities of antioxidant enzymes. Further biochemical investigations are needed to ascertain the precise mechanisms of its action.

Acknowledgement: The present research was supported by the Algerian Ministry of Higher Education and Scientific Research, General Directorate for Scientific Research and Technological Development through the Research Laboratory “Laboratory of Biochemical and Environmental Toxicology”, Faculty of Sciences, University of Badji Mokhtar-Annaba, Algeria.

REFERENCES

- Gallo MA, Lawryk NJ, Organic phosphorus pesticides, In: Hayes Jr ER, Laws ER (Eds), Handbook of Pesticide Toxicology: Classes of Pesticides, Academic Press (2) San Diego, 1991, 917-1123.
- Joshi AKR, Rajini PS, Reversible hyperglycemia in rats following acute exposure to acephate and organophosphorus insecticide: role of gluconeogenesis, *Toxicology*, 257, 2009, 40-45.
- Khūn H, Borchert A, Regulation of enzymatic lipid peroxidation: the interplay of peroxidizing and peroxide reducing enzymes, *Free Radical Biology and Medicine*, 33, 2002, 154-172.
- Giordano G, Afsharnejad Z, Guizzetti M, Vitalone A, Kavanagh TJ, Costa LG, Organophosphorus insecticides chlorpyrifos and diazinon and oxidative stress in neuronal cells in a genetic model of glutathione deficiency, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 219, 2007, 181-189.
- Seth V, Banerjee BD, Bhattacharya A, Chakraborty AK, Lipid peroxidation antioxidant enzymes and glutathione redox systems in blood of human poisoning with propoxur, *Clinical Biochemistry*, 33, 2000, 683.
- Sefi M, Bouaziz H, Soudani N, Boudawara T, Zeghal N, Fenthion induced-oxidative stress in the liver of adult rats and their progeny: Alleviation by *Artemisia campestris*, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 101, 2011, 71-79.
- Sutcu R, Altuntas I, Yildirim B, Karahan N, Demirin H, Delibas N, The effects of subchronic methidathion toxicity on rat liver: Role of antioxidant vitamins C and E, *Cell Biology and Toxicology*, 22, 2006, 221-227.
- Beauvais S, Estimation of exposure of persons in California to pesticide products that contain methidathion, California environmental protection agency, 2005, HS-1805.
- Padma V, Sowmya P, Felix AT, Baskaran R, Poornima P, Protective effect of gallic acid against lindane induced toxicity in experimental rats, *Food and Chemical Toxicology*, 49, 2011, 991-998.
- Larson RA, The antioxidants of higher plants, *Phytochemistry*, 27, 1988, 969-978.
- Akrout A, Gonzalez LA, El Jani H, Madrid PC, Antioxidant and antitumor activities of *Artemisia campestris* and *Thymelaea hirsuta* from southern Tunisia, *Food Chemical Toxicology*, 49, 2011, 342-347.
- Sefi M, Fetoui H, Soudani N, Chtourou Y, Makni M, Zeghal N, *Artemisia campestris* leaf extract alleviates early diabetic nephropathy in rats by inhibiting protein oxidation and nitric oxide end products, *Pathology Research and Practice*, 208, 2012, 157-162.
- Naili MB, Alghazeer RO, Saleh NA, Al-Najjar NA, Evaluation of antibacterial and antioxidant activities of *Artemisia campestris* (Astraceae) and *Ziziphus lotus* (Rhamnaceae), *Arabian Journal of Chemistry*, 3, 2010, 79-84.
- Ghorab H, Laggoune S, Kabouche A, Semra Z, Kabouche Z, Essential oil composition and antibacterial activity of *Artemisia campestris* L from Khenchela (Algeria), *Der. Pharmacia Lettre*, 5, 2013, 189-192.
- Aniya Y, Shimabukuro M, Shimoji M, Kohatsu M, Gyamfi MA, Miyagi C, Antioxidant and hepatoprotective actions of the medicinal herb *Artemisia campestris* from the Okinawa Islands, *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 23, 2000, 309-312.
- Dharmender S, Gurinder KS, Triazophos induced oxidative stress and histomorphological changes in liver and kidney of female albino rats, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 110, 2014, 71-80.
- Chen HY, Lin YC, Hsieh CL, Evaluation of antioxidant activity of aqueous extract of some selected nutraceutical herbs, *Food Chemistry*, 104, 2007, 1418-1424.
- Djeridane A, Yousfi M, Nadjemi B, Boutassouna D, Stocker P, Vidal N, antioxidant activity of some Algerians medicinal plants extracts containing phenolic compounds, *Food Chemistry*, 97, 2006, 654-660.
- Julkunen-Tiitto R, Phenolics constituents in the leaves of northern willows: methods for the analysis of certain phenolics, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 33, 1985, 213-217.
- Blois MS, Antioxidant determinations by the use of a stable free radical, *Nature*, 29, 1958, 1199-1200.
- Re R, Pellegrini N, Proteggenete A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C, Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay, *Free Radical Biology and Medicine*, 26, 1999, 1231-1237.
- Güney M, Demirin H, Oral B, Özgüner M, Bayhan G, Altuntas I, Ovarian toxicity in rats caused by Methidathion and ameliorating effect of vitamins E and C, *Human and Experimental Toxicology*, 26, 2007, 491-498.
- Saoudi M, Allagui MS, Abdelmouleh A, Jamoussi K, ElFeki A, Protective effects of aqueous extract of *Artemisia campestris* against pufferfish *Lagocephalus lagocephalus* extract-induced oxidative damage in rats, *Experimental and Toxicologic Pathology*, 62, 2010, 601-605.
- Buege JA, Aust SD, Microsomal lipid peroxidation, *Methods enzymol*, 105, 1984, 302-310.
- Elman GL, Tissue sulfhydryl groups, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 82, 1959, 70-77.
- Jollow DJ, Mitchell JR, Zampaglione Z, Gillette JR, Bromobenzene induced liver necrosis: Protective role of glutathione and evidence for 3, 4-bromobenzene oxide as the hepatotoxic metabolites, *Pharmacology*, 11, 1974, 51-157.
- Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB, Glutathione-S-transferase the first step in mercapturic acid formation, *Journal of Biological Chemistry*, 249, 1974, 7130-7139.
- Flohe L, Gunzler WA, Analysis of glutathione peroxidases, *Methods in Enzymology*, 105, 1984, 114-121.
- Aebi H. Catalase, In: Bergmeyer HU (ed) *Methods of Enzymatic Analysis*, Academic press, New York, 2, 1974, 673-884.
- Beauchamp C, Fridovich I, Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable 580 to acryl amide gels, *Analytical Biochemistry*, 44, 1971, 276-287.



31. Bradford MA, Rapid and sensitive method for the quantities of microgram quantities of protein utilizing the principal of protein binding, *Analytical Biochemistry*, 72, 1976, 248-254.
32. Hould R, *Techniques d'histopathologie et de cytopathologie*, Maloine (edn), 1984, 19–21, 225-227.
33. Ranjbara A, Solhib H, Mashayekhib FJ, Susanabdib A, Rezaie A, Abdollahi M, Oxidative stress in acute human poisoning with organophosphorus insecticides: a case control study, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 20, 2005, 88–91.
34. Cai Y, Sun M, Corke H, Antioxidant activity of betalains from plants of the Amaranthaceae, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 2003, 2288–2294.
35. Altuntas I, Delibas N, Demirci M, Tamer N, The effects of Methidathion on lipid peroxidation and some liver enzymes: role of vitamins E and C, *Archives of Toxicology*, 76, 2002, 470-473.
36. Sulak O, Altuntas I, Karahan N, Yildirim B, Akturk O, Yilmaz HR, Delibas N, Nephrotoxicity in rats induced by organophosphate insecticide Methidathion and ameliorating effects of vitamins E and C, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 83, 2005, 21-28.
37. Kalender S, Kalender Y, Durak D, Ogutcu A, Uzunhisarcikli M, Cevrimli BS, Yildirim M, Methyl parathion induced nephrotoxicity in male rats and protective role of vitamins C and E, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 88, 2007, 213-218.
38. Ogutcu A, Suludere Z, Kalender Y, Dichlorvos-induced hepatotoxicity in rats and the protective effects of vitamins C and E, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 26 2008, 355-361.
39. Messarah M, Amamra W, Boumendjel A, Barket L, Bouasla I, Abdennour C, Boulakoud MS, El-Feki A, Ameliorating effects of curcumin and vitamin E on diazinon induced oxidative damage in rat liver and erythrocytes, *Toxicology and Industrial Health*, 29, 2012, 77-88.
40. Kamath V, Rajini PS, Altered glucose homeostasis and oxidative impairment in pancreas of rats subjected to dimethoate intoxication, *Toxicology*, 231, 2007, 137–146.
41. Mahjoubi samet A, Fetoui H, Zeghal N, Nephrotoxicity induced by dimethoate in adult rats and their suckling pups, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 91, 2008, 96-103.
42. Ojezele MO, Abatan OM, Toxicological effects of chlorpyrifos and methidathion in young chickens, *African Journal of Biochemistry Research*, 3, 2009, 048-051.
43. French JK, Winterbourn CC, Carrel RW, Mechanism of oxyhaemoglobin breakdown on reaction with acetyl phenyl hydrazine, *Biochemical Journal*, 17, 1978, 19–26.
44. Prasanthi K, Muralidhara R, Rajini PS, Fenvalerate-induced oxidative damage in rat tissues and its attenuation by dietary sesame oil, *Food and Chemical Toxicology*, 43, 2005, 299–306.
45. Sefi M, Fetoui H, Makni M, Zeghal N, Mitigating effects of antioxidant properties of *Artemisia campestris* leaf extraction hyperlipidemia advanced glycation end products and oxidative stress in alloxan-induced diabetic rats, *Food and Chemical Toxicology*, 48, 2010, 1986-1993.
46. Mohamed M., Abdellatif MD, Sabar A, Eglammal MD, Sodium fluoride ion and renal function after prolonged sevoflurane or isoflurane anaesthesia, *British Journal of Anaesthesia*, 19, 2003, 79–83.
47. Fetoui H, Makni M, Garoui E, Zeghal N, Toxic effects of lambda-cyhalothrin, asyntheticpyrethroidpesticide, on the rat kidney: Involvement of oxidative stress and protective role of ascorbic acid, *Experimental and Toxicologic Pathology*, 62, 2010, 593–599.
48. Dolphin D, *Glutathione: Chemical, Biochemical and Medical Aspects*, Wiley J(ed), New York, 1989, Parts A and B.
49. Zwart LL, Meerman JH, Commandeur JNM, Vermeulen NPE, Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans, *Free Radical Biological Medicine*, 26, 1999, 202–226.
50. Nicotera P, Orrenius S, Role of thiols in protection against biological reactive intermediates, *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 197, 1986, 41–49.
51. Movafagh A, Maleki F, Zadeh MSG, Fada S, Association of glutathion S-transferase and chromosomal aberrations as a means to determine occupational exposure, *International Congress Series*, 1276, 2005, 197-198.
52. Kostaropoulos I, Papadopoulos AI, Metaxakis A, Boukouvala E, Papadopoulou-Mourkidou E, Glutathione S-transferase in the defense against pyrethroids in insects, *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 31, 2001, 313–319.
53. Larsen K, Najle R, Lifschitz A, Virkel G, Effects of sub-lethal exposure of rats to the herbicide glyphosate in drinking water: Glutathione-s-transferase enzyme activities, levels of reduced glutathione and lipid peroxidation in liver, kidneys and small intestine, *Environmental Toxicology Pharmacology*, 34, 2012, 811-818.
54. Dal-Pizzol F, Klant F, Bernard RJS, Moreira JCF, Mitogenic signalling mediated by oxidants in retinal treated Sertoli cells, *Free Radical Research*, 35, 2001, 749–755.
55. Hanasaki Y, Ogawa S, Fukui S, The correlation between active oxygen's scavenging and antioxidative effects of flavonoids, *Free Radical Biology and Medicine*, 16, 1994, 845–850.
56. Kasagami T, Miyamoto T, Yamamoto I, Activated transformations of organophosphorus insecticides in the case of non-AChE inhibitory oxons, *Pest Management Science*, 58, 2002, 1107–1117.
57. Jovanovic SV, Steenken S, Tosic M, Marjanovic B, Smic MG, Flavonoids as antioxidants, *Journal of the American Chemical Society*, 116, 1994, 4846–4851.

Source of Support: Nil, Conflict of Interest: None.

