الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

République Algérienne démocratique et populaire

Ministère d'enseignement supérieur et de la recherche scientifique

جامعة جيجل

Université de Jijel

Faculté des Sciences de la nature et de la vie

Département: Biologie Moléculaire et Cellulaire

كلية علوم الطبيعة والحياة

قسم البيولوجيا الجزيئية و الخلوية

Mémoire de fin d'étude

En vue de l'obtention du diplôme : Master Académique en Biologie

Option : Pharmacologie Expérimentale

Thème

Evaluation des effets hépatiques et rénaux associés à l'exposition chronique des souris au plomb et au cadmium.

Membres de jury :

Présidente : Mme BENSEGHIER Salima

Examinatrice : Mme ROUIBAH Hassiba

Encadreur : Dr KEBIECHE Mohamed

Co-encadrant: Melle CHOUITE Zyneb

Présenté par :

BOUCHERIM Karima

BOUHARBIT Sarra

BOULAHMAR Wissame

Année Universitaire 2015- 2016.

Remerciements

Nous remercions tout d'abord Dieu, le tout puissant et le maitre de l'univers qui nous a donné la nécessaire, la forte volonté et la patience afin d'accomplir ce travail et qui nous a toujours guidé vers le bon chemin.

Nos remerciements les plus sincères d'abord à notre encadreur

Dr. KEBIECHE Mohamed qui nous a suivis tout au long de ce travail, pour ces conseils avisés et pour sa disponibilité.

Nos remerciements profondes à notre Co-encadreur

Melle CHOUITE Zyneb, pour l'encadrement continu qu'elle m'a assuré lors de la réalisation de cette étude.

A Mme BEN SEGHIER Salima qui nous a fait l'honneur de présider ce jury.

Nos sincères considérations vont également à Mme ROUIBAH Hassiba qui a accepté d'examiner ce travail.

Nous remercions tout particulièrement nos collègues de la filière pharmacologie expérimentale.

Liste des figures

Figure 1 : les Sources et cibles des espèces réactives de l'oxygène (ROS) …….12
Figure 2 : Mécanisme et cibles possibles pour l'effort oxydant Pb-induit……..... .14
Figure 3 : l'effet de plomb sur le métabolisme de GSH ……..... 15
Figure 4 : Mécanismes cellulaires de la toxicité Cd-induite et rôle central dans l'effort oxydant ……... .16
Figure 05 : la mort autophagique des cellules par hépatotoxicité cadmium-induite....…. .19
Figure 06: mécanisme inflammatoire induit par l'activation des cellules Kupffer et les macrophages par l'intermédiaire des ROS cadmium induit …….. .19
Figure 07 : structure fonctionnelle des reins ……. .20
Figure 08 : schéma représente le transporte de cd et leur rôle dans la néphrotoxicité.... ...22
Figure 09 : les voies de signalisation après la prise de Cd en cellules endothéliales 24
Figure 10 : Principe de dosage du glutathion…….… 28
Figure 11: Principe du dosage du MDA ……..…. .29
Figure 12: Variation du taux de catalase cytosolique chez les différents groupes de souris exposées aux métaux lourds …….....32
Figure13 : Variation du taux de GST cytosolique chez les différents groupes de souris exposées aux métaux lourds …….....33
Figure 14 : Variation du taux de GSH cytosolique dans le foie et les reins chez les différents groupes de souris exposées aux métaux lourds ……..…... 34
Figure 15 : Variation de MDA cytosolique dans le foie et les reins chez les différents groupes de souris exposées aux métaux lourds.……..... 35

Liste des tableaux

Tableau1 : Les doses sélectionnées……..... 25

Tableau02 : Variation des paramètres biochimiques du sang chez les différents groupes de souris exposées aux métaux lourds. ……..... 36

Liste des abréviations

ALA : Acide δ-aminolévulinique

ALAD : Acide δ-aminolévulinique déhydratase

ALAS : Acide δ-aminolévulinique synthétase

ALP : Alkaline phosphatase

ALT : Alanine aminotransferase

AST : Aspartate aminotransferase

CAT: Catalase

Cd: Cadmium

eIF 2α : Eukaryotic Initiation Factor 2α

GPX: Glutathion peroxydase

GSH: Glutathion réduit

GSSG: Glutathion oxydée

GST: Glutathion S- transférase

Hg: Mercure

MDA: Malondialdhyde

MTs: Métallothioneines

Pb: Plomb

SIRT3: Sirtuine 3

SOD: Superoxyde dismutase

TGO : Transaminase Glutato- Oxaloacétique

TGP : Transaminase Glutato- pyruvique

UPR : Unfolded protein Respons

y- GCS: y- glutamyl cystéine- synthétase

Sommaire

Liste des figures i
Liste des tableaux ii
Liste des abréviations iii
Introduction 01

Partie I : Synthèse bibliographique

Chapitre01 : Généralité

I- Les métaux lourds toxiques 03
I-1 - Le plomb 03
I-1-1- La toxicocinétique du plomb 04
I-1-2 -La toxicité du plomb 04
a) La toxicité aigue 04
b) La toxicité chronique 05
I-2-Le cadmium 06
I-2-1- La toxicocinétique du cadmium 06
a) La toxicité aigue 06
b) La toxicité chronique 06
I-2-2- La toxicité du cadmium 07

Chapitre 02 : Le stress oxydatif et les métaux lourds

I-Stress oxydatif 09
I-1-Définition 09
I-2-Les sources des radicaux libres oxygénés 09
I-3- Système antioxydants 10
I-3-1-Système antioxydant enzymatique 10
I-3-1-1-Superoxyde dismutase (SOD) 10
I-3-1-2-Glutathion peroxydase (GPx) 10
I-3-1-3-Catalase (CAT) 10

I-3-2-Système antioxydant non enzymatique 11
I-3-2-1-Glutathion (GSH) 11
I-3-2-2-Vitamine E 11
I-3-2-3-Vitamine C 11
I - 4- Cibles biologiques du stress oxydatif 12
I-4-1- Peroxydation lipidique 12
I-4-2- Oxydation des protéines 12
I-4-3- Oxydation de l'ADN 12
II-Mécanisme de génération des ROS par les métaux lourds 13
II-1-Le stress oxydatif plomb-induit 13
II-2-Le stress oxydatif cadmium-induit 15

Chapitre 03 : Hépatotoxicité et néphrotoxicité liées aux métaux lourds

I- La structure fonctionnelle du foie 17
II- Hépatotoxicité liée aux métaux lourds 17
II-1- Hépatotoxicité induite par le plomb 18
II-2- Hépatotoxicité induite par le cadmium 18
III- Anatomie fonctionnelle des reins 20
III-1-Disposition générale 20
III-2- Le néphron 21
III-3- Les différentes fonctions des reins 21
IV- La néphrotoxicité liée aux métaux lourds 21
IV-1- Cadmium 21
IV--2 Plomb 22
V- L'effet génique des métaux lourds 23
V -1- La génotoxicité liée au cadmium 23
V- 2- La génotoxicité liée au plomb 24

Partie II : partie expérimentale

I- Matériel 25
I-1-Entretien des animaux 25
I-2-Les métaux et les doses choisies 25
II-Méthodes 26
II-1-Préparation des solutions 26
II-2-Traitement des animaux 26
II-3-Sacrifice des animaux 26
II-4- Evaluation des différents paramètres du stress oxydant dans le foie et les reins 26
II-4-1-Evaluation de l'activité des enzymes antioxydantes.....26
II-4-2-Préparation de la fraction cytosolique 27
II-4-3-Dosage des protéines totales 27
II-4-4-Evaluation de l'activité enzymatique de la catalase (CAT) 27
II-4-5- Evaluation de l'activité de la glutathion-S- transférase (GST) 28
II-5-Détermination du taux du glutathion réduit (GSH) 28
II-6- Estimation de la peroxydation lipidique 29
II-7- dosages biochimiques.....29
II-7- 1- Le dosage des marqueurs enzymatiques (TGO, TGP) 29
II-7- 2- Dosage de la créatinine sérique 30
II-7-3- Dosage de l'urée.....30
II- 8- Etude statistique 31
III-Résultats et interprétation 32
III-1- Résultats de l'évaluation des différents paramètres du stress oxydant dans le foie et les reins 32
III-1-1-Evaluation de l'activité enzymatique de la catalase (CAT) 32
III-1-2- Estimation de l'activité de la glutathion-S- transférase (GST) 33
III-1-3 Détermination du taux du glutathion réduit (GSH) 34

III-1- 4 - Estimation de la peroxydation lipidique (MDA cytosolique) 35

III - 2 - Résultats de l'évaluation des paramètres biochimique du sang 36

IV- Discussion 38

IV-1- Effet des métaux lourds sur le foie 38

IV-1-1- Altération du statut redox cytosolique 38

IV-1-2- Dysfonctionnement hépatique 40

IV-1-2-1- Augmentation du taux des transaminases (TGO et TGP) 40

IV-2- Effet des métaux lourds sur les reins 40

IV-2-1- Altération du statut redox cytosolique rénal 40

IV-2-2- Evaluation de la fonction rénale 41

Conclusion et perspectives 42

Références bibliographiques 43

Annexes

Introduction

La pollution de l'environnement par les métaux lourds est une préoccupation environnementale majeure qui suscite un grand intérêt ces dernières années. De plus, l'exposition chronique à ces métaux est extrêmement toxique tant pour l'homme que pour l'animal par leur capacité à s'accumuler dans l'organisme vivant **(Yildirim *et al.* 2011 ; Agrawal *et al*. 2014 ; Cobbina *et al.* 2015)** via différentes voies d'exposition, en l'occurence, l'inhalation d'air souillé et l'ingestion d'eau et les aliments contaminés par ces métaux **(Grara *et al*. 2012).**

Le plomb et le cadmium représentent un risque d'intoxication chronique réel sur la santé publique parce qu'ils possèdent une activité toxique sur plusieurs organes particulièrement le foie et les reins **(Melila, 2012 ; Reckziegel *et al.* 2016)**, organes faisant l'objet de la présente étude. Les effets de ces deux métaux sont multiples et complexe, les dommages intracellulaire générés concernant tous les type de biomolécules : la peroxydation lipidique, cassure d'ADN, dénaturation de certaines protéines et surexpression de nombreux gènes.Tous ces effets peuvent être simultanés ou produits en cascade **(Patra, 2011 ; Al-Attar, 2011 ; Greco *et al.* 2012 ;)**. L'un des mécanismes responsable d'effets toxiques de plomb et de cadmium sont les mécanismes renfermant en général la production des espèces réactives de l'oxygène (ROS). Ces dernier, à leur tour sont susceptibles d'induire un stress oxydatif **(Al-Attar, 2011 ; Patra, 2011 ; Melila, 2012).** L'évaluation de la toxicité de Pb et de Cd sur l'organisme est réalisée par l'utilisation des marqueurs du stress oxydant qui jouent un rôle important dans le profil toxicologique, mais ils sont insuffisants pour évaluer le risque de ces deux métaux. L'étude de biomarqueur cellulaire représente actuellement une nouvelle approche largement utilisée pour l'analyse biochimique **(Belli *et al*. 2009).**

Une attention toute particulière est actuellement portée sur la contamination des organismes vivants par les polluants, en l'occurrence les métaux lourds à travers les matrices biologiques alimentaires et aussi à travers la respiration de l'air chargé de ces métaux, surtout sous forme de micropolluants. Cette étude se veut le privilège d'investir le risque de cette toxicité chez la population générale qui est généralement non concernée par les mesures de prévention et de suivi médical contrairement aux groupes professionnels exposés à ces métaux et les patients subissant des toxicités accidentelles. Dans cette présente étude, nous avons voulu évaluer la toxicité de l'organisme vivant par le Pb et Cd en utilisant des doses réelles apportées par les travaux de recherches de Habila (2014) (résultats non publiés) qui montrent des teneurs élevées de Pb et Cd, respectivement 5.88 mg/kg et 0.32 mg/kg chez les poissons vivant dans l'eau douce (barrage de Beni Haroun) dépassant largement les concentrations recommandées par la Communauté Economique Européenne (CEE) **(CEE *in* Levret *et al.* 2008).**

Cette étude est axée sur le choix d'un model expérimental de souris exposées chroniquement (6 mois) à des doses réelles. Une évaluation biochimique est réalisée sur le statut redox cytosolique des cellules hépatiques et rénales ainsi qu'une évaluation de la fonction de ces deux organes.

PARTIE I :
Synthèse Bibliographique

Chapitre 01 : Généralités

I- Les métaux lourds

Les métaux sont une classe particulière des toxiques. Ils sont présents à l'état stable dans l'environnement, mais leur forme chimique peut être modifiée par des facteurs physico-chimiques, biologiques, ou par les activités humaines **(Lauwerys and Dominique, 1990)**. Ils sont persistants dans l'environnement, qui signifie qu'ils ne peuvent pas être dégradés. Les métaux lourds sont les éléments métalliques naturels dont la masse volumique dépasse 5g/cm^3 et qui possèdent un numéro atomique élevé. Ils sont présents dans tous les compartiments de l'environnement, mais en général en quantités très faibles **(Gregory *et al.* 2015).** Les métaux sont généralement séparés en deux catégories selon leur caractère essentiel ou non pour les êtres vivants. Bien que certains soient nécessaires pour la vie (fer, sélénium, cobalt, cuivre, manganèse, molybdène et zinc), ou très toxiques même en faibles quantités et n'atteignent aucun objectif de soutenir la vie tels que le plomb (Pb), le mercure (Hg) et le cadmium (Cd) **(AL- Attar, 2011)**.

À l'échelle mondial, le cadmium, le mercure et le plomb constituent les trois toxiques environnementaux les plus dangereux. Ils sont des perturbateurs de l'équilibre pro-oxydant/Antioxydant et de l'homéostasie biologique. La toxicité individuelle de ces substances est bien connue en toxicologie environnementale, mais il y a un manque de données comparatives sur les variables indicatives concernant leur effet sur le statut redox cellulaire **(Agrawal *et al.* 2014)**.

I-1 - Le plomb

Le plomb est un métal toxique naturellement présent dans l'écorce terrestre. Dans de nombreuses parties du monde, la généralisation de son usage a entraîné une importante contamination de l'environnement **(Attia *et al.* 2013)**. L'exposition humaine au plomb, même à faibles doses, est responsable à de graves problèmes de santé publique. Il se diffuse dans l'organisme pour atteindre le cerveau, le foie, les reins et les os. En particulier, chez les enfants de moins de 6 ans, le plomb peut leur causer des troubles neurologiques, hématologiques, gastro-intestinaux, reproductifs et immunologiques. Il est stocké dans les dents et les os (**Gillis *et al.* 2012).**

Les propriétés physico-chimiques du plomb sont très importantes pour la compréhension des mécanismes de biodisponibilité et l'action de ce métal. Le plomb est un métal lourd, gris bleuté qui se ternit à l'air. Il est mou, malléable et flexible. Le plomb fond à environ 328 C°, sa masse atomique est égale à 207,20. Il possède une forte densité **(Alian, 2005)**. Les variations de pH au niveau des sols comme au niveau des liquides biologiques peuvent expliquer les différences de sa biodisponibilité. Ainsi, le plomb possède aussi une densité de charge, c'est-à-dire un rayon ionique

et une charge de valence identique à celle du calcium **(Morin, 1999).** De même, l'affinité du plomb pour le soufre peut expliquer sa fixation sur certaines enzymes ou sur les groupements thiols de molécules comme le glutathion réduit, à l'origine de quelques mécanismes d'action **(Lauwerys and Dominique, 1990).**

I-1-1- La toxicocinétique du plomb

Le plomb pénètre essentiellement dans l'organisme par voie digestive et pulmonaire, cette dernière voie est très importante pour les personnes exposées en milieu professionnel inhalant le plomb sous forme particulière. Chez la population générale, le plomb peut être ingéré avec les aliments contaminés et les eaux de boisson, surtout les eaux douces riches en calcaire (**CIREI, 2001)**, le toxique peut être aussi pénétrer par voie cutanée, favorisé par des lésions de la peau, et pour certains composés organiques grâce à leur liposolubilité **(Alian, 2005)**.

L'absorption digestive des dérivés du plomb est plus importante chez l'enfant que chez l'adulte : à exposition égale, l'organisme de l'enfant absorbe 50 % du plomb ingéré, tandis que la proportion chez l'adulte est seulement de 5 à 7 % **(Achour *et al.* 2014).** Le plomb absorbé passe dans la circulation sanguine où plus de 90% avec une demi-vie de 35 jours, est fixé aux érythrocytes au niveau de la membrane et de l'hémoglobine. Le reste diffuse dans le sérum, et est ensuite distribué aux diverses organes et tissus (le foie, les reins, le cerveau) **(Alian, 2005).**

D'après **Sharma et ses collaborateurs (2011),** le plomb est distribué dans 2 types de tissus :

- **Les tissus mous** : Rein, foie, cerveau, moelle osseuse. Il a une demi-vie de 40 jours dans ces tissus. Ces 4 organes cibles représentent 10% du stockage du plomb.
- **Les tissus durs** : Os, dents. Le stockage est quasi-permanent : la demi-vie est de 7 à 10 ans.

Ces tissus durs stockent 90% du plomb.

Le plomb absorbé majoritairement éliminé par voie urinaire (75%) le reste éliminé par la bile environ 16%, la sécrétion gastro-intestinal et autre voies d'élimination : Cheveux, sueur, phanères et salive **(Achour *et al*. 2014)**.

I-1-2 -la toxicité du plomb

a) La toxicité aigue

L'intoxication aigue au plomb se manifeste différemment selon qu'elle survient chez l'enfant ou chez l'adulte.

- **Chez l'enfant** : L'intoxication au plomb est caractérisée par l'anorexie, les vomissements, l'irritabilité et les trouble de comportement **(Bismuthe *et al.* 2000)**.

- Chez l'adulte : Elle se manifeste cliniquement par un goût métallique, des douleurs abdominales (coliques) et la constipation. Ces symptômes se manifestent généralement lorsque la plombémie atteint1, 44 à 2,4 mol/l. Par ailleurs, l'intoxication sévère peut provoquer des convulsions, le coma et parfois même la mort, tant chez l'enfant que chez l'adulte **(Alian, 2005)**.

b) La toxicité chronique

Sur le plan de la toxicité chronique, on admet qu'une dose quotidienne de 1 mg de plomb est suffisante pour engendrer rapidement le saturnisme. Le saturnisme peut se manifester de façon extrêmement différente d'une personne à l'autre, chaque atteinte viscérale pouvant être inaugurale **(Alian, 2005)**.

- **Les manifestations digestives :** se traduisent par la colique de plomb, qui se traduit par une crise abdominale douloureuse très violente évoluant par paroxysmes. Elle peut en imposer pour une urgence chirurgicale mais il n'y a pas de contracture et les douleurs s'accompagnent d'un poul calme, bien frappé, d'une élévation modérée de la tension artérielle et d'une constipation. Deux signes rares permettent d'orienter vers l'intoxication par le plomb : Un liseré gingival bleu grisâtre au collet des incisives et des canines ou des taches de même couleur de la muqueuse jugale **(Achour *et al.* 2014)**.

-Les troubles neurologiques : Chez l'enfant à partir de 100 à 300 µg/l de plomb sanguin : trouble comportementaux, stagnation ou régression du développement intellectuel, chez l'adulte à partir de 400 à 700 µg /l de plomb sanguin : Se manifestant par une fatigue, maladresse, irritabilité, trouble mnésiques atteintes de système nerveux périphérique **(Garnier *et al.* 2013)**.

- **L'atteinte rénale** : Le plomb peut produire deux types d'atteinte rénale ; une tubulopathie proximale qui s'observe en cas de contamination importante traduit par une fuite de protéines de faibles point moléculaires, et d'autre atteinte rénale tardive ; qui observe après 10 à 30 ans d'exposition, c'est une insuffisance rénale modérée due à des lésion glomérulaires et tubulo-interstitielle **(Bismuthe *et al.* 2000)**.

-Troubles hématologiques : L'effet toxique du plomb peut également se manifester par une anémie en inhibant des enzymes responsables de la synthèse d'un des constituants de l'hémoglobine **(Jacques and claude, 2000)**.

-Cancérogénicité : Sa cancérogénicité a été démontré chez l'animal mais insuffisamment démontré chez l'homme **(Achour *et al.* 2014)**.

I-2-Le cadmium

Le cadmium (Cd) est considéré comme un souci principal pour la santé publique **(Ambily *et al.* 2013)**, et un polluant environnemental bien-reconnu avec de nombreux effets de santé défavorables (**Berroukche *et al.* 2014)**. Généralement la source primaire de l'exposition de Cd chez l'homme c'est les légumes et les céréales qui sont la source principale du Cd alimentaire. Un peu de pourcentage de Cd est trouvé dans les produits à base de viande et les poissons, excepté les crustacés et les mollusques qui accumulent un taux élevé vivant dans des environnements aquatiques souillés **(Satarug *et al.* 2000 ; Satarug *et al.* 2010)**. D'autres sources d'exposition au Cd incluent le tabagisme, l'exposition professionnelle et la poussière de maison (**Ambily *et al.* 2013)**. Beaucoup d'études ont indiqué que le cadmium s'accumule préférentiellement dans les tissus hépatiques et rénaux avec de longues demi-vies biologiques de 15-30 ans. Cette demi-vie est prolongée à cause du bas taux d'excrétion corporelle **(Satarug *et al.* 2010 ; Samuel *et al.* 2011).** Les propriétés physico-chimiques majoritaires de ce métal sont : Une couleur blanche et bleuâtre, mou, malléable, ductile et résistant à la corrosion. Son point de fusion est d'environ 321°C et son point d'ébullition d'environ 765°C. Le cadmium, même à l'état solide, se transformant rapidement dans l'air sous forme d'un oxyde métallique. Il est insoluble dans l'eau et dans la plupart des solvants organiques **(Falcy *et al.* 2016)**.

I-2-1- La toxicocinétique du cadmium

Le cadmium pénètre dans l'organisme principalement par voie respiratoire (l'absorption de la quantité inhalée est de l'ordre de 50%), accessoirement par voie digestive avec l'alimentation et l'eau de boisson (l'absorption porte sur 3 à 7% de la quantité ingérée). Il circule dans le sang en grande partie liée à l'hémoglobine et se fixe de façon diffuse, mais surtout au niveau du rein, du foie et des poumons, après liaison aux groupements thiols (SH) d'une protéine de transport et de stockage, la métallothionéine, dont il induit d'ailleurs la synthèse intracellulaire. Sa demi-vie biologique après stockage dépasserait 15 ans. Il s'élimine très lentement, surtout par voie urinaire et digestive, accessoirement par la sueur et la salive. On peut aussi le retrouver dans les phanères (les cheveux des sujets non exposés en renfermeraient 0.02 à0.3 $\mu g.g^{-1}$). Son passage au travers de la barrière placentaire est faible **(Alian, 2005 ; Falcy *et al.* 2016)**.

I-2-2- La toxicité du cadmium

a)La toxicité aigue

L'intoxication aigue de cadmium chez l'homme est surtout la conséquence des effets locaux : après ingestion, les manifestations cliniques sont des nausées, des vomissements et des douleurs abdominales importantes **(Frank, 1992)**. Des études démontrent aussi qu'une inhalation aigue de

Cd peut causer la mort chez les animaux de même que chez l'humain. Plusieurs cas d'expositions aigues accidentelles et mortelles ont été rapportées chez l'humain. Pendant ces expositions aigues, les symptômes initiaux relativement faibles durant quelques jours sont suivis d'œdème pulmonaire sévère et de pneumonie menant au décès causé par un arrêt respiratoire **(Skipper *et al.* 2016)**.

b) la toxicité chronique

De façon réaliste, c'est suite à des expositions répétées à de faibles doses que la population générale risque d'être affectée par la toxicité du Cadmium. Les effets d'une exposition chronique sur différents organes seront détaillés ci-dessous.

- **Atteinte d'os et l'Itai-Itai-maladie**

Plusieurs études en 20 ème siècle ont montré un raccordement entre l'intoxication de cadmium et les dommages d'os. Le cadmium a pu également être montré pour être associé en l'occurrence à la maladie d'Itai-Itai, qui a été observée pour la première fois au japon, due à une consommation sur une longue durée d'aliments contenant des niveaux élevés de cadmium, ce syndrome est caractérisé par l'association d'une insuffisance rénale avec une ostéoporose et ostéomalacie **(Johannes *et al* . 2006)**.

- **Les dommages rénaux**

Des dommages de rein depuis longtemps ont été décrits pour être le problème principal pour des patients chroniquement exposés au cadmium **(Johannes *et al.* 2006)**. L'accumulation de cadmium dans les cellules épithéliales du tubule proximal entraîne un dysfonctionnement de la réabsorption généralisée et caractérisée par une polyurie, protéinurie des protéines à faible masse moléculaire **(Frank, 1992**). On croit habituellement que le cadmium s'accumule dans les cellules des tubules proximaux, donnant une variété des effets toxiques relativement non spécifiques qui conduisent à la mort des cellules épithéliales rénales à travers des mécanismes nécrotiques ou apoptotique **(Walter *et al.* 2012)**.

- **Cancérogénicité du cadmium**

La lutte contre le cancer est l'axe de recherche biomédicale le plus important des dernières années. Il existe plusieurs types de mécanismes impliqués dans la cancérogenèse induite par le cadmium. L'exposition au Cd a été associée aux cancers de poumons, de la prostate, du pancréas, du foie et des reins (**Maisons, 2012)**. Les mécanismes de cancérisation sont principalement indirects. Plusieurs études ont montré que le Cd ne peut se lier à l'ADN que dans des expériences *in*

vitro et *in vivo*, le Cd a une affinité beaucoup plus grande pour d'autres molécules comme les métallothionéines **(Waalkes, 2003)**.

Chapitre 02 : Le stress oxydatif et les métaux lourds

I-Stress oxydatif

I-1-Définition

Selon les points de vue actuels, le stress oxydant peut être défini comme étant un déséquilibre entre la production et l'élimination des métabolites réactifs de l'oxygène et du nitrogène **(Lü *et al*. 2010 ; Melila *et al*. 2012)**, en faveur de leur production conduisant à des dommages potentiels et à des dégâts cellulaires irréversibles. Le stress oxydatif joue un rôle pathologique dans le développement de nombreuses affections et des toxicités chez les êtres vivants. La surproduction d'espèces réactives de l'oxygène et des radicaux libres au-delà de la capacité intrinsèque des cellules pour neutraliser, suite à l'exposition des xénobiotiques conduisant à un état de stress oxydatif et des dommages sur les lipides, l'ADN et les protéines **(Patra *et al*. 2011 ; Soazig, 2014)**.

I-2-Les sources des radicaux libres oxygénés

La production des ROS peut être exogènes tels que les métaux lourds, les rayonnements ionisants et les rayons ultra-violets, les polluants atmosphériques tels que la fumée de cigarette mais également des médicaments (paracétamol, anthracyclines…) (**Poljsak, 2011)**. Soit d'origine endogène représentée principalement par:

- **La mitochondrie**

C'est la source prépondérante des ROS, par l'intermédiaire de sa chaîne respiratoire **(Droge, 2002; Favier, 2003**). En effet, environ 2 à 5 % de l'oxygène font l'objet d'une réduction monovalente suite à une fuite des électrons dans la chaîne respiratoire qui a lieu dans la membrane interne mitochondriale. Cette fuite se produit principalement au niveau des complexes I (NADH déshydrogénase) et III (complexe cytochrome bc1) même si le complexe II (succinate déshydrogénase) mène à la production du radical superoxyde ($O_2^{-\circ}$), le précurseur des ROS (**González *et al.* 2014)**.

- **NADPH oxydase**

Elle a été initialement décrite dans les cellules phagocytaires ou elle joue un rôle fondamental dans la réponse immunitaire, dans la lutte contre les microorganismes. Elle est spécialisée dans la production du radical superoxyde selon la réaction suivant **(Segal, 2008)** :

$$2O_2 + NADPH \xrightarrow{NADPHOxydase} 2O^{-\circ}_2 + NADP^+ + H^+$$

- **Xanthines oxydase**

Catalyse la réduction de l'hypoxanthine en xanthine et la xanthine en acide urique dans cette réaction l'oxygène moléculaire agit comme un accepteur d'électron produisant ainsi des radicaux superoxydes **(González *et al.* 2014)**.

I-3- Système antioxydants

I-3-1-Système antioxydant enzymatique

I-3-1-1-Superoxyde dismutase (SOD)

Cette enzyme assure l'élimination de l'anion superoxyde. Elle est présente majoritairement au niveau cytoplasmique et exprimée dans toutes les cellules avec une activité plus importante au niveau du foie, du cerveau et les neurones (**Redler *et al.* 2012)**. C'est la première espèce toxique formée à partir de l'oxygène par transformation de ($O_2^{-\circ}$) en (H_2O_2), (**Patri *et al*. 2009 ; Umapathy *et al*. 2013),** selon la réaction suivante (**Cheng *et al*. 2014)** :

$$O_2^{-\circ} + 2H \xrightarrow{SOD\ (Cu/Zn)} H_2O_2 + O_2$$

I-3-1-2-Glutathion peroxydase (GPx)

Est la plus importante enzyme de détoxification de H_2O_2 chez les mammifères, son rôle principal est d'éliminer la peroxydation résultant du stress oxydatif, la GPx est devisée en deux types l'un étant indépendant des ions sélénium, c'est le glutathion S- transférase (GST) et l'autre dépendant des ions sélénium dans son cite catalytique (GPX). Cette dernière est plus importante car elle catalyse l'oxydation du GSH **(Zhu *et al.* 2008)** selon la réaction suivante (**Cheng *et al.* 2014)** :

$$2\ H_2O_2 + 2GSH \xrightarrow{GPx\ (Se)} GSSG + 2H_2O$$

I-3-1-3-Catalase (CAT)

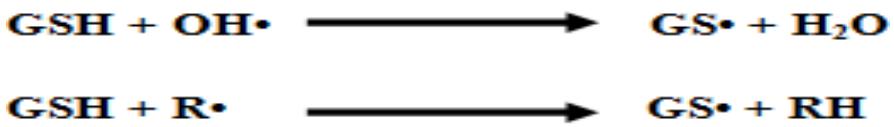
Les catalases sont des enzymes peroxysomales catalysant la dismutation du peroxyde d'hydrogène en H_2O. Elle est majoritairement retrouvée dans les hépatocytes, les érythrocytes et les cellules rénales (**Liu *et al.* 2009),** selon la réaction suivante (**Cheng *et al.* 2014)** :

$$2H_2O_2 \xrightarrow{CAT(Fe)} 2H_2O + O_2$$

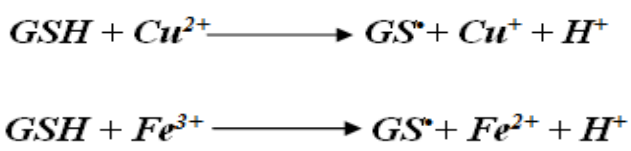
I-3-2-Système antioxydant non enzymatique

I-3-2-1-Glutathion (GSH)

Le glutathion ou γ-L-glutamyl-L-cystéinglycine est un tripeptide ubiquitaire produit dans différents tissus **(Marcel, 2013)**, dont la concentration cellulaire peut atteindre dans certaines cellules animales 5 mM. Grâce à son groupement SH libre, le glutathion constitue le principal antioxydant propre à la cellule. Il peut, en effet, non seulement réduire H_2O_2 en eau et des peroxydes de types ROOH en alcools, mais également interagir directement avec les ROS formés par l'oxydation des vitamines E et C, baissant ainsi les niveaux de peroxydation lipidique (**Belli *et al.* 2009)**, selon la réaction :

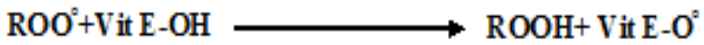


Le glutathion peut également réagir avec les ions Fe^{3+} et Cu^{2+} et ainsi limiter leur participation à la génération des radicaux libres par la réaction de Fenton :



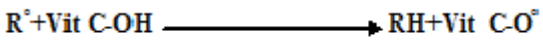
I-3-2-2-Vitamine E

Les α-tocophérols jouent un rôle protecteur en captant un électron et en empêchant la propagation de la peroxydation lipidique induite par un stress oxydant (**Jalili *et al.* 2007 ; Al-Attar, 2011**), selon la réaction suivante :



I-3-2-3-Vitamine C

L'acide ascorbique, la forme réduite de vitamine C est l'élément nutritif essentiel pour les cellules de mammifères. Sa concentration plasmatique dépendant fortement de l'alimentation et des modifications du flux hépatique. Elle capte l'anion super oxyde (O_2°) et le radical hydroxyl (OH°) **(Michels and Frei, 2013) :**



I - 4- Cibles biologiques du stress oxydatif

Le stress oxydatif dû aux radicaux libres entraîne des dégâts tissulaires essentiellement par l'oxydation des protéines, de l'ADN ou des lipides.

I-4-1- Peroxydation lipidique

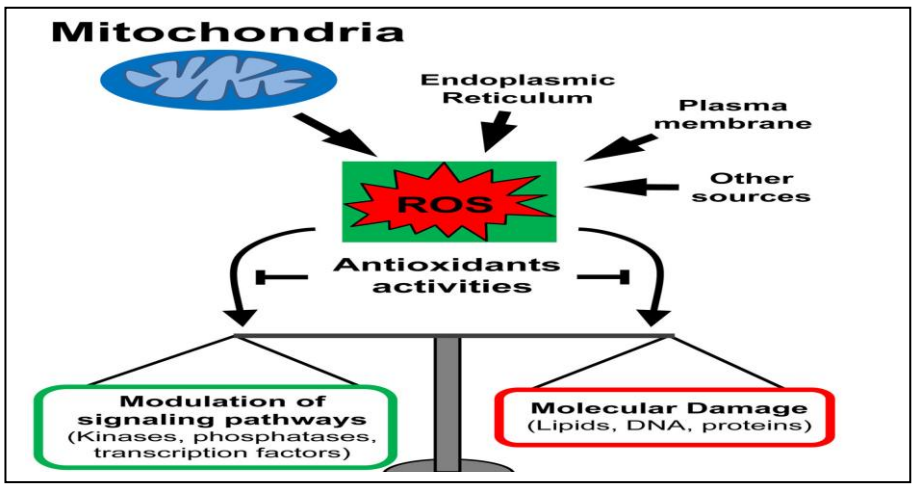
Les premières cibles des ROS sont les lipides, notamment ceux présents dans les membranes cellulaires et subcellulaires. Les membranes riches en acides gras polyinsaturés (AGPI) sont très sensibles à l'oxydation en raison de leur degré élevé d'insaturation **(Kupsco and Schlenk, 2015)**. L'oxydation des lipides génère des peroxydes lipidiques qui sont eux-mêmes très réactifs. La peroxydation de lipides induit une modification de la fluidité, de la perméabilité et de l'excitabilité des membranes **(Cheng, 2014).**

I-4-2- Oxydation des protéines

Les radicaux libres sont à l'origine d'une réaction qui entraîne la dénaturation des acides aminés. Cette dégradation provoque la modification des structures des protéines et notamment des structures secondaires et tertiaires **(Aurousseau *et al.* 2004; Baudin, 2006**). Il y a souvent la formation d'une liaison disulfure lors des réactions d'oxydation. Il peut alors apparaître une modification de la structure cellulaire mais aussi une perte d'activité enzymatique de certaines protéines directement liées à leur structure dans l'espace et un dysfonctionnement des signaux de défense ou de prolifération **(Kupsco and Schlenk, 2015)**.

I-4-3- Oxydation de l'ADN

Les ROS ont une grande affinité de réaction avec certaines bases constitutives de l'ADN (guanine) ; pour la transformer en 8-hydroxy-2'déoxyguanosine (8-OH2DG) qui est capable d'induire des mutations spécifiques (figure 1) **(Favier, 2003 ; Kupsco and Schlenk, 2015).**



<u>Figure 01</u> : les Sources et cibles des espèces réactives de l'oxygène (ROS) **(Hekimi *et al*. 2011).**

II-Mécanisme de génération des ROS par les métaux lourds

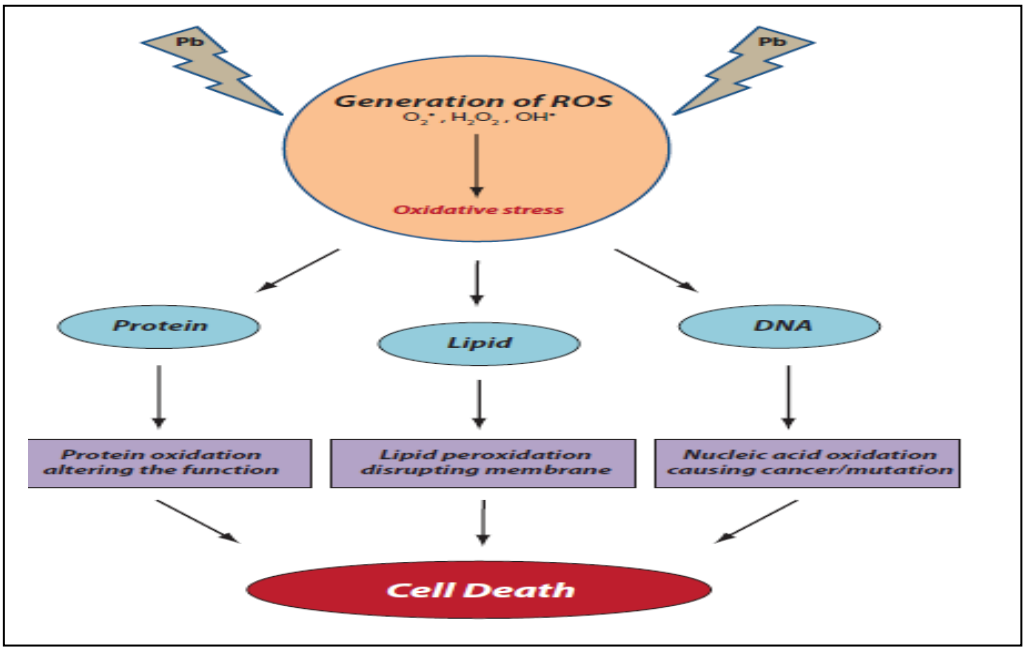
De nombreuses études précédentes démontrent le rôle des métaux lourds dans la formation des ROS, parmi ces métaux on retrouve le mercure, le cadmium et le plomb constituant les trois toxique environnementaux les plus dangereux perturbateurs de l'équilibre pro-oxydant et l'homéostasie antioxydant **(Agrawal *et al*. 2014)**.

La génération des ROS après l'exposition chronique de ces métaux et liée à leur capacité à exister sous différents états d'oxydation, en effet, les cations d'éléments comme le fer, Cu, Cr ou Mn sont capable de céder un ou plusieurs électrons susceptibles de réduire l'oxygène et ses dérivés. Les plus communes de ces réaction sont les réaction de fenton, par ailleurs, même des métaux qui n'existent que sous un seul état d'oxydation tel que le Cd et Pb par exemple peuvent induire une accumulation des ROS par trois raisons :

- Une perturbation de certaines voies métabolique et une déficience des enzymes du système antioxydants ou par épuisement du stock de molécules antioxydants comme (l'acrobate, le glutathion, la vitamine E) soit par l'inhibition de systèmes enzymatiques antioxydants telles que la SOD, la CAT et la GPx (**Ambily *et al.* 2013)**.

II-1-Le stress oxydatif plomb-induit

L'activité pro-oxydante du plomb a été étudiée et démontrée dans de nombreuses recherches, le plomb joue *in vitro* un rôle catalyseur des réactions de peroxydation lipidique, après l'incubation de l'acide arachidonique avec le plomb, le produit final de stress oxydatif (MDA) a augmenté avec le nombre des doubles liaisons des acides gras (**Patra *et al*. 2011)**. Par ailleurs, le mécanisme exacte, *in vivo,* de l'induction de stress oxydatif par le Pb est connu par l'empêchement de la voie de biosynthèse de l'hème par l'inhibition des enzymes essentielles impliquées dans cette synthèse l'acide δ-aminolévulinique déhydratase (ALAD), une enzyme cytosolique qui catalyse la formation du porphobilinogène de l'acide δ-aminolévulinique ; acide aminolévulinique synthétase (ALAS), une enzyme mitochondriale qui catalyse la formation de l'acide aminolévulinique, mais son effet sur ALAD est plus profond et son inhibition a été employée médicalement pour mesurer le degré d'empoisonnement de Pb. L'inhibition d'ALAD a pour conséquence l'accumulation de l'acide δ-aminolévulinique (ALA) (**Sharma *et al*. 2011; Flora *et al*. 2012 ; Agrawal *et al.* 2014)**. L'accumulation de l'acide δ-aminolévulinique (ALA) lors de l'exposition chronique au Pb induit la production des ROS tels que le superoxyde et peroxyde d'hydrogène (figure 2) (**Kansal *et al*. 2011)**.



<u>Figure02</u> : Mécanisme et cibles possibles pour le stress oxydant Pb-induit (**Flora *et al*. 2012).**

Ainsi l'exposition prolongée au Pb s'accompagne d'une augmentation de la production des dérivés actifs de l'oxygène et l'inhibition de systèmes de défense antioxydants tell que la SOD et la CAT. La diminution de la concentration en SOD réduit la disposition du radical superoxyde, tandis que la réduction de la CAT altère le balayage du radical superoxyde. Le Pb peut également remplacer les ions de zinc qui servent de cofacteurs importants à ces enzymes (**Sharma *et al*. 2011 ; Flora *et al*. 2012**).

Zhai et ces collaborateurs (2015) ont démontré la diminution de l'activité de Cu-Zn-SOD, causée par l'interaction entre le Pb et le cuivre, un métal nécessaire au fonctionnement de l'enzyme SOD cytosolique.

L'autre possibilité de l'épuisement de réserves antioxydantes sous l'influence du plomb connue par l'inhibition de métabolisme de GSH, c'est un antioxydant important pour éteindre les radicaux libres. Le glutathion existe sous la forme réduite (GSH) et oxydée (GSSG). GSH peut être régénérer du GSSG par la glutathion réductase (GR) (figure 03). Dans des conditions normales, 90% de tout le contenu de glutathion existe sous la forme réduite (GSH) et environ 10% est sous la forme oxydée (GSSG). Dans des conditions de stress oxydant, la concentration de GSSG est beaucoup plus haute que celle de GSH, par ce que le Pb inactive le glutathion en se liant aux groupes sulfhydriques présents dans ce tripeptide et l'inhibition de GPx.

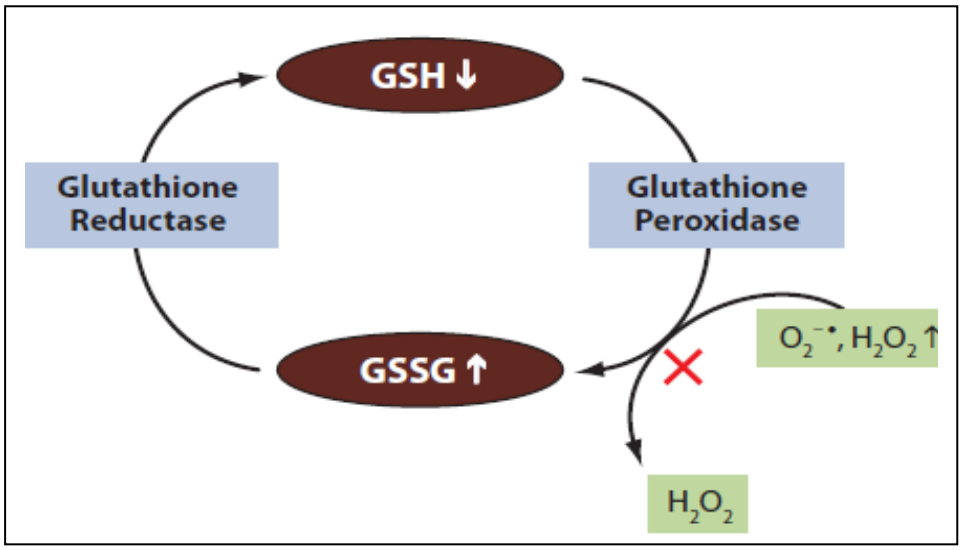


Figure 03 : l'effet de plomb sur le métabolisme de GSH (**Flora *et al*. 2012)**.

II-2-Le stress oxydatif cadmium-induit

La toxicité du cadmium a été démontrée dans plusieurs organes qui est responsable sur l'apparition des dommages dans le tissu à travers la création d'un stress oxydant, par conséquent, ce dernier joue un rôle central comme mécanisme fondamentale en pathologie Cd -induite **(Patra *et al.* 2011)**. En fait, les mécanismes exacts d'action du Cd semblent être multiples et les quatre principales hypothèses émises sont :

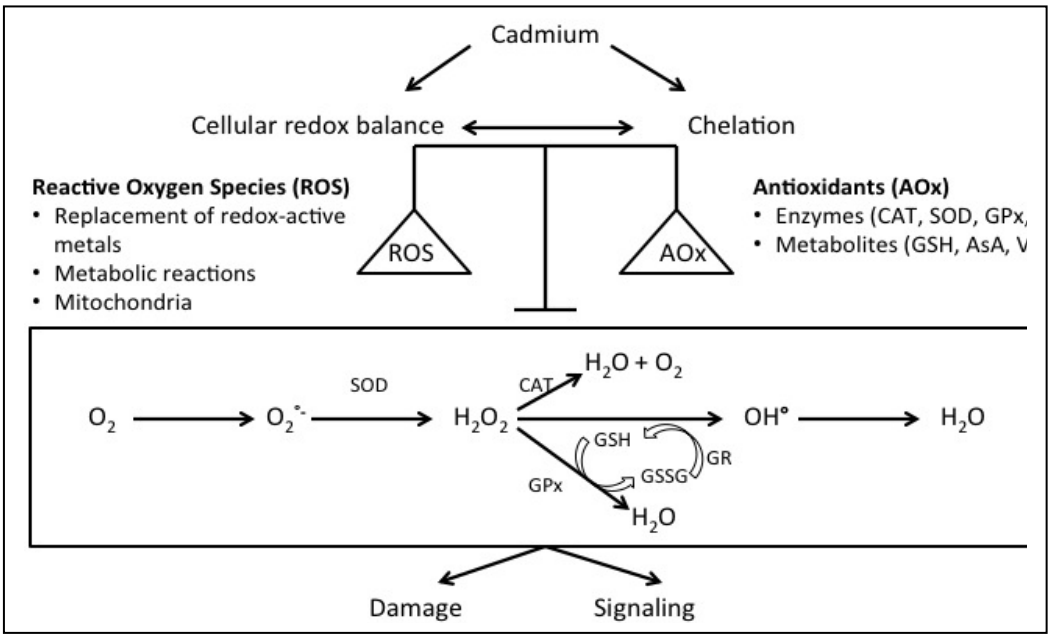
1- La liaison du Cd aux groupements sulfhydriles de certaines molécules comme le GSH (**Tarasub *et al*. 2012)**.

2 - Il réduit aussi les défenses antioxydantes par l'inhibition des enzymes antioxydantes de stress telle que la SOD, CAT et GPx. En raison de cette inhibition, la chaîne de transport d'électron devient fortement réduite ; des électrons sont transférés directement à l'oxygène disponible menant à la formation augmentée des espèces réactives de l'oxygène (ROS). Le ROS peut augmenter le stress oxydant dans les tissus, les dommages cellulaires, la peroxydation des lipides de membrane et la perte d'enzymes attachées aux membranes **(Liu *et al*. 2009).**

3- La capacité du Cd de remplacer le Fe augmente la disponibilité de Fe libre dans les cellules et par conséquent induisant le stress oxydant. Le fer à son tour produit les radicaux hydroxyles fortement préjudiciables (OH°) par l'intermédiaire de réaction de fenton (**Cuypers *et al*. 2010**).

4- L'autre possibilité du mode d'action de Cd est son effet sur le déplacement d'autres métaux tels que le Fer et le Cu qui se lient normalement à des métalloprotéines en cédant la place au Cd, c'est

pourquoi on constate une augmentation de leur concentration dans le sang, (figure 4) (**Klaassen *et al*. 2009)**.



<u>Figure 04</u>: Mécanismes cellulaires de la toxicité Cd-induite et rôle central dans l'effort oxydant (**Ambily *et al.* 2013)**.

Chapitre 03 : Hépatotoxicité et néphrotoxicité liées aux métaux lourds

I- La structure fonctionnelle du foie

Le foie est une volumineuse glande annexe du tube digestif, il remplit plusieurs fonctions essentielles et complexes de synthèse et de transformation de diverses substances. Il se situe entre les poumons et le diaphragme, il comprend deux éléments principaux : un volumineux lobe droit et un petit lobe gauche. Chacun est constitué des petites unités fonctionnelles, les lobules. Le sang passe à travers ces lobules et subit d'importants changements dans sa composition **(Elaine, 2008 ; Morin, 2006)**.

Les principales fonctions du foie sont le métabolisme des aliments après leur digestion, le recyclage des globules rouges et l'élimination des substances toxiques de sang. Donc le foie joue un double rôle essentiel :

Métabolisme hépatique: Les hépatocyte jouent un rôle particulièrement important dans le métabolisme des glucides, des lipides et des protéines, ils assurent le maintien de la normoglycémie par une fonction glycogénique. Les hépatocytes emmagasinent une partie des triacylglycérols, métabolisent des acides gras pour produire de l'ATP et retirent le groupement amine des acides aminés en donnant la possibilité de ces derniers à servir pour la production de l'ATP ou à être transformés en glucides ou en lipides **(Gerard and Bryane, 2009)**.

***Elimination des déchets* :** Le foie assure également l'élimination des déchets endogènes tels que la bilirubine produite par le catabolisme de l'hème, la synthèse d'urée à partir de l'ammoniaque issue du catabolisme des protéines et son élimination par voie biliaire et l'élimination des xénobiotiques comme les médicaments et les toxiques **(Alian, 2005)**. Ils existent d'autres fonctions non négligeables telles que la filtration de certaines substances du sang afin qu'elles ne s'accumulent pas et ne causent pas des dommages dans le sang et l'organisme. Ces substances peuvent provenir de l'intérieur ou de l'extérieur du corps, la production de la chaleur pour le maintien de la température corporelle, le stockage des vitamines et des minéraux et aide aussi le corps dans la production des facteurs de coagulation **(Gerard and Bryane, 2009)**.

II. Hépatotoxicité liée aux métaux lourds

L'hépatotoxicité est définie comme étant le pouvoir existant chez une substance chimique (les métaux, les pesticides…) susceptible de provoquer des dommages hépatique. La toxicité du foie se manifeste sous forme d'inflammation ou encore de nécrose.

II-1- Hépatotoxicité induite par le plomb

Le Plomb (Pb) est un métal toxique omniprésent dans l'environnement qui induit un large éventail de dysfonctionnement chez le foie. Bien que le mécanisme exact de la toxicité induite par le plomb n'a pas été complètement étudiée, mais les données cumulatives ont montré que le stress oxydatif joue un rôle essentiel dans sa toxicité **(Kansal *et al.* 2011)**. La surproduction des espèces réactives de l'oxygène (ROS) induit des lésions hépatiques conduisant à une insuffisance hépatique, ce qui produit par conséquent une sécrétion élevée des enzymes sérique de marquage hépatique telles que l'alanine aminotransferase (ALT) (**Sharma, 2011 ; Attia *et al.* 2013)**, aspartate aminotransferase (AST)et alkaline phosphatase (ALP), une perte d'intégrité de l'architecture fonctionnelle de membrane cellulaires hépatique par l'augmentation de la concentration de malondialdhyde (MDA) hépatique est aussi observée **(Attia *et al.* 2013 ; Pal *et al.* 2013).**

II-2- Hépatotoxicité induite par le cadmium

Le foie est un organe cible, attaqué par les ROS mitochondriaux produits suite à une exposition chronique au cadmium **(Amamou *et al.* 2015 ; Pi *et al.* 2015)**, principalement, l'anion superoxyde mitochondrial impliqué dans la mort autophagique des cellules hépatiques (**Son *et al.* 2011 ; Pi *et al.* 2015).** L'autophagie est une voie majeure de catabolisme lysosomal qui permet la dégradation des macromolécules, les organites endommagés et le recyclage du matériel cytoplasmique (**Chiarelli and Roccheri, 2012 ; Lavallard and Gual, 2014 ; Malaviya *et al*. 2014)** pour maintenir l'homéostasie cellulaire et de fournir des substrats pour la génération d'énergie cellulaire (**Son *et al.* 2011 ; Lavallard and Gual, 2014 ; Wang, 2015)**.

Ce phénomène autophagique se déroule par la voie SIRT3/SOD2 qui assure l'hémostasie entre les ROSm et le flux autophagique. L'exposition au cadmium diminue l'expression et l'activité de SIRT3(Sirtuin). Cette protéine à son tour réduit l'activité de SOD2 par l'augmentation de l'acétylation de SOD2 qu'est un enzyme antioxydant éliminateur de $O_2^{\cdot}$, produit par le cadmium (figure 5) (**Pi *et al.* 2015).**

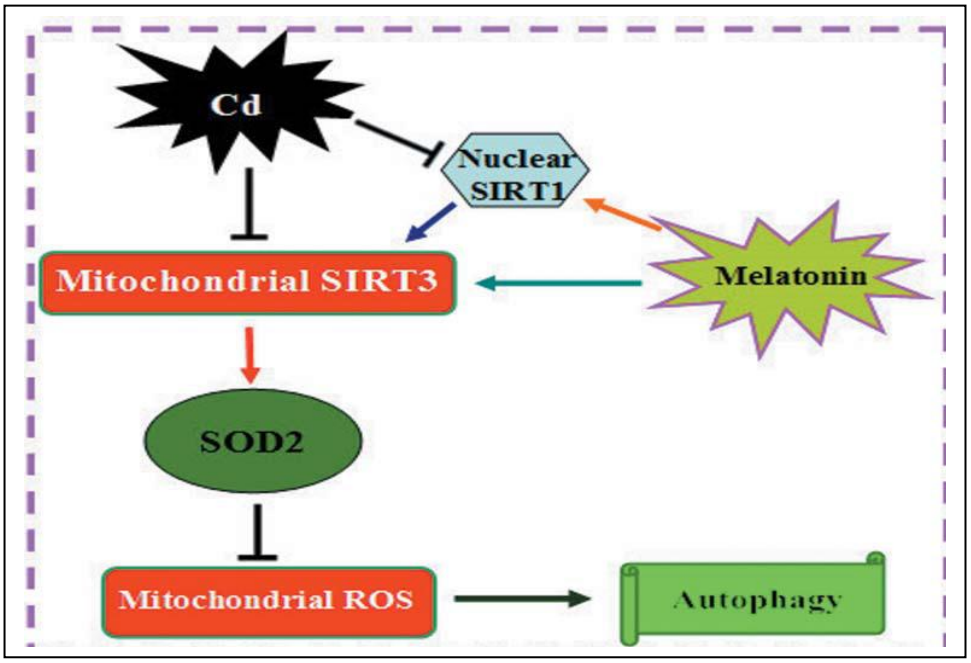


Figure 05 : La mort autophagique de cellules par hépatotoxicité cadmium-induite **(Pi et *al.* 2015).**

- L'inflammation cadmium-induite dans le foie est un autre mécanisme important du stress oxydant. Les études documentées montrent que la surcharge de cadmium dans le foie est responsable sur l'activation des cellules Kupffer et les macrophages résidents dans le foie pour libérer les médiateurs inflammatoires tels que (IL-1β, TNF-q, Il-6 et IL-8) (figure 6) **(Liu *et al.* 2009).**

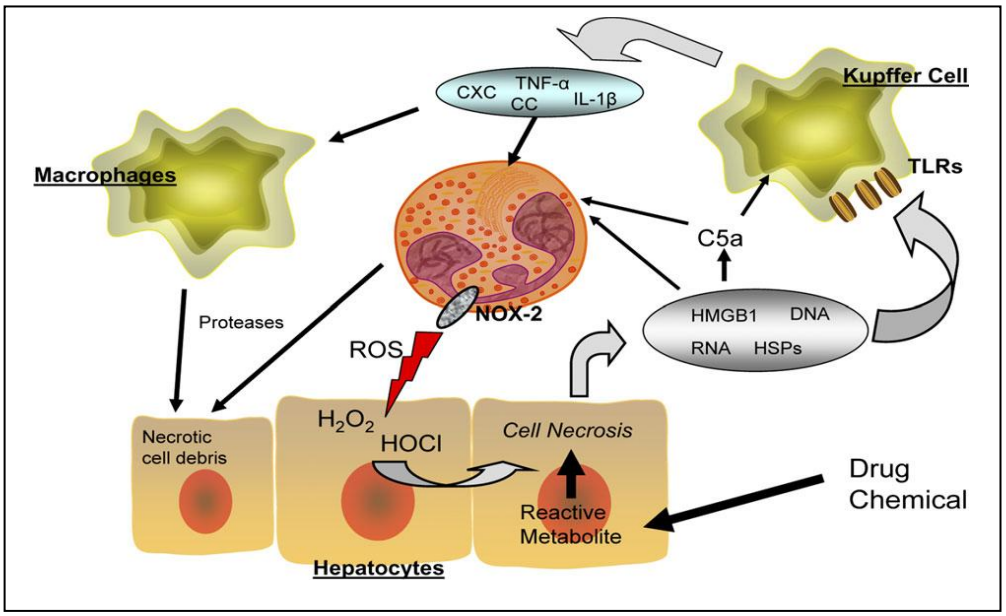


Figure06 : Mécanisme inflammatoire induit par l'activation des cellules Kupffer et les macrophages par l'intermédiaire des ROS cadmium induits **(Adams *et al.* 2010).**

III- Anatomie fonctionnelle des reins

III-1-Disposition générale

Les reins sont des organes vitaux qui comportent deux zones bien distinctes :

La médullaire est formée par 8 cônes , appelés les pyramides de Malpighi dont l'extrémité interne dénommée papille, fait saillie dans les calices et dont la base externe jouxte le cortex périphérique.

Le cortex est une coiffe de base des pyramides de Malpighi et s'insinue entre les pyramides constituant les colonnes de Bertin. Les pyramides de Malpighi envoient des rayons médullaires appelés pyramides de Ferrein dans le cortex appelé labyrinthe **(Gerard and Bryane, 2009)**.

III-2- Le néphron

Est l'unité fonctionnelle du rein. Chaque rein comporte environ 1300 000 néphrons qui contient du glomérule qui est un bouquet de capillaires, et un tubule rénal dont l'extrémité fermée est évasée pour former de coupe (figure7) **(Eliane, 2008 ; Zhuo and Li, 2013)**.

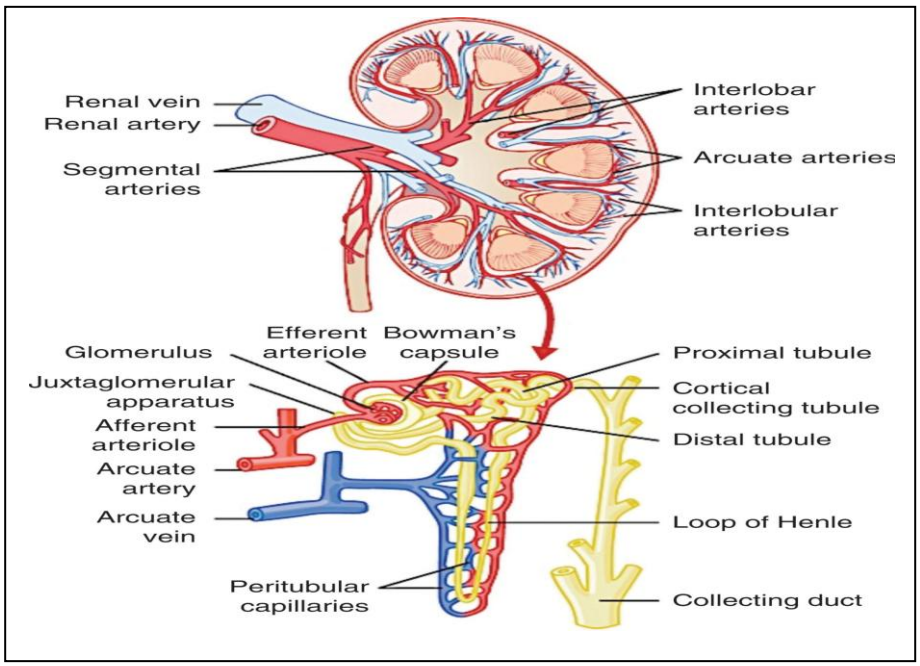


Figure 07 : Structure fonctionnelle des reins **(Chade, 2013).**

III-3- Les différentes fonctions des reins

Le rein est un organe spécial qui joue un rôle central dans le maintien du volume et de la composition ionique des fluides de l'organisme **(Chade, 2013)**. Cette homéostasie est assurée par la filtration glomérulaire et les modifications tubulaires (réabsorption et sécrétion). Les modifications importantes du débit urinaire et celles de la composition des urines traduisent les capacités du rein à

s'adapter à une situation physiologique ou pathologique donnée **(Sibernagl and Despopoulos, 1996)**.

Le rein est la principale voie d'excrétion des déchets métaboliques (potentiellement toxiques comme l'urée, l'acide urique, la créatinine et l'acide oxalique) et des produits chimiques exogènes (toxines, médicaments) (**Habuka *et al.* 2014)**. Il participe également au catabolisme des protéines de faible poids moléculaire et à l'interconversion métabolique (néoglucogenèse, métabolisme lipidique) qui régule la composition des fluides biologiques. Enfin, le rein participe aux fonctions endocrines de l'organisme et le site de production de nombreuses hormones **(Eliane, 2008)**.

IV- La néphrotoxicité liée aux métaux lourds

IV-1- Cadmium

L'augmentation de la charge corporelle tout au long de la vie par l'exposition chronique de Cd se fait surtout dans le foie et les reins par l'intermédiaire des métallothionéines (MTs) et d'autres transporteurs de Cd comme les transporteurs de Zn et de Cu **(Jacques and Claude, 2000 ; Salińska *et al.* 2011)**.

La MT est donc une protéine intracellulaire qui a un double rôle lors d'intoxications chroniques au Cd. Elle diminue généralement la toxicité du Cd et d'autres métaux en liant les cations métalliques électrophiles, qui autrement interagissent avec des molécules cibles par des attaques nucléophiliques **(Klaassen *et al* . 2009 ; Cho *et al.* 2010)** . Par ailleurs, le Cd lié à la métallothionéine dans le foie puis le complexe (Cd-MT) libéré dans la circulation sanguine est filtré au niveau des glomérules et réabsorbé dans les tubules proximaux (PT) par l'endocytose au niveau de cellules épithéliales. Dans les cellules tubulaires la MT est dégradée par les lysosomes et libération du Cd, une partie de Cd absorbé peut être liée avec des groupements thiols de GSH et L- cystéine **(Prozialeck and Joshua, 2012)**.

En **2015, Yang et Shu** démontrent la synthèse de MT dans les cellules tubulaires qui est stimulée par le Cd présent dans le cortex rénal, mais quand celui-ci atteint des niveaux supérieurs à 200 µg/g, la synthèse de MT ne suffit plus et les niveaux de Cd non lié sont suffisamment hauts pour causer des dommages tubulaires (figure 8).

Le premier signe de lésions rénales causées par le Cd est habituellement une dysfonction tubulaire, mise en évidence par l'augmentation de l'excrétion des protéines ayant un faible poids moléculaire suivie par d'autres signes de dysfonction rénale, telles que la protéinurie glomérulaire

se traduisant par une excrétion urinaire des protéines de masse moléculaire plus élevée (ex: l'Albumine) probablement due à des lésions glomérulaires.

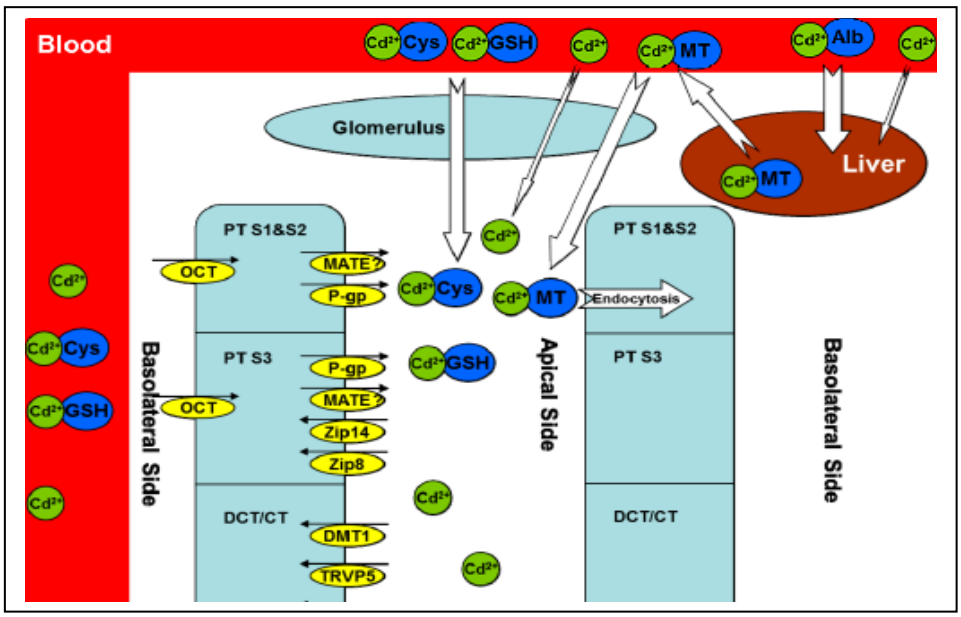


Figure 08: Schéma représente le transport de Cd et son rôle dans la néphrotoxicité **(Yang and Shu, 2015)**.

IV-2 Plomb

La néphrotoxicité liée à l'empoisonnement de plomb à été fréquemment rapportée dans des études épidémiologiques. La génération élevée des espèces réactives d'oxygènes après l'exposition au plomb peut entrainer la mobilisation systématique et l'épuisement de l'antioxydant des cellules de défense intrinsèque. Ces mécanismes entrainent une accumulation des ROS nocifs responsables à l'apparition des dommages tissulaires et biomoléculaires au niveau rénal (**Zhai *et al.* 2015)**.

L'anomalie fonctionnelle rénale peut être de deux types : La néphropathie aigue est caractérisée fonctionnellement par un mécanisme de transport tubulaire avec des corps d'inclusion nucléaire contenant des complexes des protéines et plomb. Elle ne fait pas apparaître les protéines dans l'urine mais peut provoquer l'excrétion anormale du glucose, des phosphates et des acides aminés. La néphropathie chronique d'une part est beaucoup plus grave peut mener au changement fonctionnel et morphologique irréversible. Elle se caractérise par les changements glomérulaires et tubulo-interstitiels donnant une hypertension rénale (**Flora *et al.* 2012)**.

V- L'effet génique des métaux lourds

V-1- La génotoxicité liée au cadmium

L'effet génotoxique de Cd n'est pas directement et faiblement mutagène sur les cellules de mammifère. Beaucoup des études documentent la présence au moins de trois mécanismes d'action jouant un rôle prédominant dans la génotoxicité du Cd :

1- L'induction indirecte d'espèces réactives de l'oxygène, ce qui entraine la rupture de brins d'ADN par action directe sur la chromatine **(Greco *et al.* 2012)**.

2- L'inhibition de la réparation de l'ADN : Le mécanisme moléculaire précis impliqué dans l'inhibition de la réparation de l'ADN par le Cd n'est pas clairement identifié, il semblerait que le cadmium puisse agir au niveau de la réparation ou l'accumulation de 7,8-dihydro-8-oxoguanine de l'ADN par inactivation d'une série de protéines impliquées dans la première étape de réparation de base par excision telles que 8-oxoguanine-DNA glycosylase **(Hartwig, 1994)**.

3- L'effet de Cd sur l'expression des gènes et le signal de transduction intracellulaire peut altérer la prolifération cellulaire, l'apoptose et la nécrose et d'autres fonctions cellulaires.

D'après **Messner et ces collaborateurs, (2016)** l'augmentation de la perméabilité membranaire du Cd interfère avec la concentration de Ca^{+2} interne qui joue un rôle sur la voie alternative de transduction des différents signaux de régulation cellulaire. Le cadmium peut donc altérer l'homéostasie calcique du fait de ses capacités à induire l'effort de RE dans les cellules endothéliales en raison de la production des radicaux réactifs de l'oxygène (ROS) par le déclanchements de la voie de signalisation de l'UPR (Unfolded protein Respons), ainsi la phosphorylation de facteur d'initiation de la traduction eIF2α (eukaryotic Initiation Factor 2α) par UPR responsable sur la formation d'autophagosome s'accompagne par une autophagie. Le processus de la mort endothéliale Cd-induite des cellules devient encore toujours compliqué, car il est maintenant prouvé que le Cd déclenche une forme programmée de la mort nécrotique de cellules accomplie par la rupture des lysosomes.

Le déséquilibre de Ca^{+2}cadmium-induit peut être aussi comme conséquence d'un phénomène apoptotique par la transmission du signal de la mort cellulaire assuré par le Ca^{+2}et clivage d'une famille des protéases non lysosomiales de cystéine Ca^{+2}-dépendantes connues sous le nom de calpains (**Smith *et al.* 2012)**. L'autre possibilité de l'effet génique de Cd est connue par la perturbation de l'expression de certains gènes tels que les suppresseurs de tumeur p53, des études précédentes démontrent que le Cd endommage l'ADN des cellules endothéliales même aux concentrations inférieures menant à la mort de cellules avec la participation de p53 (figure 9).

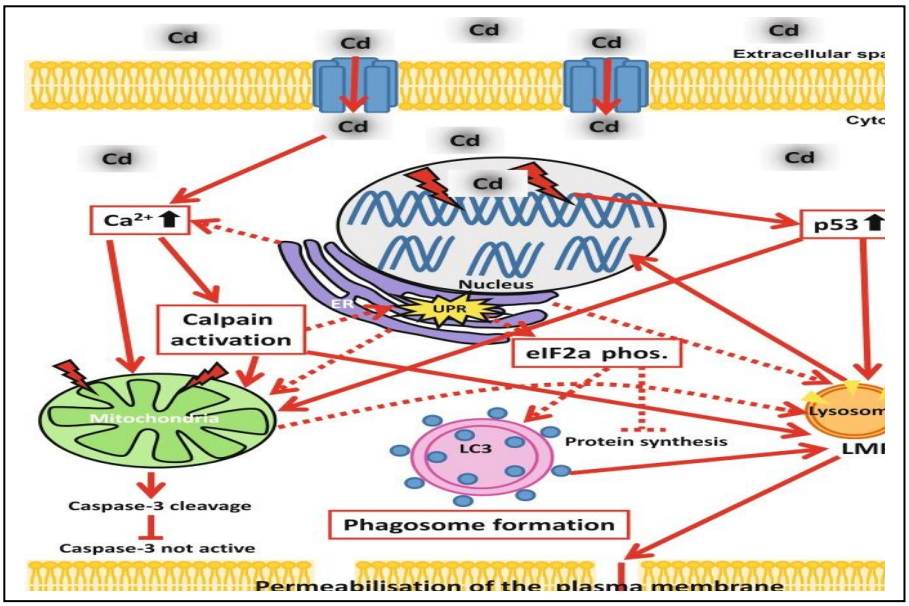


Figure 09 : Les voies de signalisation Cd-induite en cellules endothéliales **(Messner *et al.* 2016).**

V- 2- La génotoxicité liée au plomb

Le plomb (Pb) est un métal cancérogène aux humains et les animaux d'expérience. Cependant les mécanismes fondamentaux ne sont pas toujours compris. Selon les études réalisées par la culture des cellules de mammifères, le Pb est faiblement mutagénique après une longue durée d'incubation, d'ailleurs. Au cours de la période d'exposition au plomb la réparation des coupures d'ADN rayon-X- induite a été inhibée par l'interaction des ions de Pb avec les enzymes impliquées dans le traitement d'ADN et leur réparation, dans ce contexte le Pb diminue la fidélité de l'ADN polymérase **(Hartwig, 1994)**.

Un mécanisme de génotoxicité a été également soutenu par plusieurs articles mentionnant la possibilité des cassures de brins d'ADN par un agent d'alkylation comme suit:

L'ALAD est plus sensible à l'effet toxique de Pb, l'inhibition de l'activité enzymatique de ce dernier responsable à l'accumulation d'ALA qui induit la génération des ROS, les attaqueurs d'ADN. Le produit final d'oxydation d'ALA est 4,5 acide dioxovalerique qui est un agent d'alkylation efficace au sein d'ADN **(Sharma *et al.* 2011)**.

PARTIE II :

Partie expérimentale

Matériel et méthodes

L'objectif de notre travail est l'évaluation *in vivo* des risques hépatiques et rénaux liés à l'exposition chronique au plomb au cadmium à faibles doses. Le traitement des animaux a été élaboré dans l'animalerie de la faculté des SNV, l'évaluation des paramètres du stress oxydant a été effectuée au laboratoire de toxicologie moléculaire de l'université de Jijel et le dosage des paramètres biochimiques a été effectué au niveau de laboratoire central de l'hôpital d'EL- Milia.

I- Matériel

I-1--Entretien des animaux

Les souris utilisées au cours de cette étude sont des souris femelles de souche *Wistar Albinos* provenant de l'institut Pasteur d'Alger, pesant environ 30g. Ces souris sont maintenues dans l'animalerie du département des SNV, Université de Jijel, rangés dans des cages. Les animaux ont été maintenus dans des conditions de température et d'humidité standards (la température 24± 2°C et hygrométrie 60%) avec un cycle de 12h de (lumière /obscurité), ils ont eu libre accès à la nourriture et à l'eau distillée.

I--2-Les métaux et les doses choisies

Les métaux choisis dans cette étude sont le plomb et le cadmium, dont les doses ont été adoptées selon les travaux de recherche de Habila, 2014 (résultats non publiés) (Tableau1) où l'étude a été menée sur les poissons de barrage de Beni harone. Cette étude a prouvé que la teneur en plomb et en cadmium dépasse largement les concentrations recommandés par la Communauté Economique Européenne (CEE), ces valeurs sont de l'ordre de 0,05 µg/g et 0,3 µg/g de Cadmium et de plomb respectivement **(CEE *in* Levret *et al.* 2008).**

Tableau1 : Les doses sélectionnées

L'élément	La dose µg/kg
Pb	882 µg/kg
Cd	48 µg/kg

Pour convertir la concentration des métaux dans les poissons à des doses quotidiennes dans les études expérimentales sur des animaux, nous avons utilisé un facteur de conversion qui est de 0.15 chez la souris **(EFSA, 2011).**

II-Méthodes

II-1--Préparation des solutions

Dans cette étude, et afin de préparer les solutions destinées pour le traitement journalier des animaux, nous avons utilisé l'acétate de plomb et le chlorure de cadmium, donc nous avons préparé trois solutions :

- La première solution est constituée par l'acétate de plomb dissous dans l'eau distillée avec une concentration adaptée pour avoir une dose égale à 882µg/kg.
- La deuxième solution c'est la solution de chlorure de cadmium dissous dans l'eau distillée avec une concentration appropriée pour avoir une dose égale à 48µg/kg.
- Pour préparer la troisième solution nous avons mixé les deux sels (acétate de plomb et chlorure de cadmium) avec l'eau distillée.

II-2-Traitement des animaux

Les animaux ont été répartis au hasard en 04 groupes (12 souris / groupe).

Groupe I: Témoin, ils ont reçu 0.1ml de l'eau distillée par gavage pendant 6 mois.

Groupe II: Les animaux ont reçu 0.1ml de la solution aqueuse d'acétate de plomb (882µg/kg) par gavage pendant 6 mois.

Groupe III: Les animaux ont reçu 0.1ml de la solution aqueuse de chlorure de cadmium (42µg/kg) par gavage pendant 6 mois.

Groupe VI: Les animaux ont reçu 0.1ml de la solution aqueuse d'une mixture (882µg/kg et 42µg /kg) de l'acétate de plomb et de chlorure de cadmium respectivement pendent 6 mois par gavage.

II-3-Sacrifice des animaux

Le sang prélevé sur héparine de lithium à l'aide d'un tube capillaire au niveau de l'œil (sinus rétro-orbital), et est centrifugé à 3600 tours/ minute pendant 5 minute, le sérum récupéré est utilisé pour les analyse biochimiques.

Pour l'étude tissulaire, les animaux sont sacrifiés par décapitation à différent intervalles de temps. Ensuite, le foie et les reins ont été prélevés, rincés dans l'eau physiologique à 4°C puis congelé à (-20°C) pour réaliser les dosages tissulaires du stress oxydatif (MDA, GSH, GST et CAT).

II-4- Evaluation des différents paramètres du stress oxydant dans le foie et les reins

II-4-1-Evaluation de l'activité des enzymes antioxydants

La mesure des activités enzymatiques de la catalase (CAT), le glutathion -S- transférase (GST), impliquées dans la réponse au stress oxydant induit par le plomb, le cadmium et la mixture, a été réalisée sur les mêmes échantillons utilisés pour le dosage des protéines totales solubles en utilisant la méthode spectrophotométrique à l'aide de spectrophotomètre (JASCO V-630).

II-4-2-Préparation de la fraction cytosolique

La préparation de la fraction cytosolique a été réalisée comme suit : à l'aide d'un mortier et un pilon placé dans la glace, 1g de foie ou 0.4g du tissu rénal a été homogénéisé avec 3 volume du tampon phosphate (KH_2PO_4 + K_2HPO_4) à (0.1M, pH 7.4) contenant du KCl (1.17%). L'homogénat est centrifugé à 3000g par la centrifugeuse (Segma- 16 K) pendant 10 min pour séparer les débris cellulaires. Le surnageant est ensuite centrifugé à 10000 g durant 30 minutes et le surnageant final est utilisé comme source des enzymes cytosoliques et les autres paramètres du stress oxydatifs.

II-4-3-Dosage des protéines totales

La teneur en protéines a été quantifiée par la méthode de **(Bradford, 1976).** Pour cela, 100 ml du concentré bleu de Coomassie a été dilué dans 100 ml de l'eau distillée, puis 4 ml de ce colorant dilué a été ajouté à10 µl de l'échantillon dilué à 1/10 ^{ème}. Le mélange a été incubé à température ambiante pendant 30 min et une mesure d'absorbance a été prise à 595 nm par le spectrophotomètre (JASCO V- 630). L'albumine de sérum bovin a été utilisée comme standard (BSA).

II-4-4-Evaluation de l'activité enzymatique de la catalase (CAT)

Les catalases sont responsables de la dégradation de H_2O_2 empêchant ainsi cette molécule de participer à la réaction de Fenton. Elles sont localisées dans le peroxysome des cellules de nombreux type tissulaires, mais sont particulièrement abondantes dans le foie et les globules rouges.

L'activité enzymatique de la CAT a été estimée par la méthode de **(Clairborne, 1985)** (avec modification) dont le principe est basé sur la disparition de l'H_2O_2 en présence de la source enzymatique à 25 C° selon la réaction suivante :

$$2H_2O_2 \xrightarrow{\text{Catalase}} 2H_2O + O_2$$

Procédure: Brièvement, dans une cuvette en quartz, 50µl de la source enzymatique (fraction cytosolique) a été ajouté à 1ml de tampon phosphate (0.1M, pH7.4). La réaction est déclenchée après l'addition de substrat H_2O_2 (0.019M) ensuite l'absorbance a été immédiatement mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à 240 nm, chaque lecture dure 2min dont les DO de t_0, après 1 minute et après 2 minutes ont été notées. Les résultats sont exprimés en UI/g de protéines selon l'équation suivante.

UI /g de protéine=2.303/T x log (DO1/DO2)

T : Intervalle de temps en minute.

A1 : Correspond à la DO à t_0.

A2 : Correspond à la DO à t.

II-4-5- Evaluation de l'activité de la glutathion-S- transférase (GST)

L'activité de la GST a été évaluée selon la méthode de **(Habig *et al.*1974)**. Elle consiste à fournir à l'enzyme un substrat, en général du chlorodinitrobenzéne (CDNB), qui réagit facilement avec de nombreuses formes de GST et de glutathion.

Procédure : Brièvement, un milieu réactionnel se constitue de 850µl de tampon phosphate d'une concentration égale à 0.1M et un pH 6.5 et 50 µl et de réactif de CDNB à 20 mM a été incubé dans un bain marie à37°c pendant 10 min, puis la réaction est déclenchée par l'ajout de 50µl d'une solution de GSH de 20mM et 50µl de la fraction cytosolique. La réaction de conjugaison entre le GSH te le CDNB en présence de l'enzyme GST donne un composé qui absorbe à 340nm. Chaque lecture dure 3min dont les DO de t_0, après 1 minute, après 2 minutes et après 3 minutes ont été notées. Les résultats sont exprimés en UI/mg de protéines selon la formule :

$$K= (DO_{échantillon} - DO_{controle})\times 100/(9,6\times 0,05)$$

II-5-Détermination du taux du glutathion réduit (GSH)

Le dosage de glutathion réduit est effectué selon la méthode de **(Ellman, 1959)**. La méthode du dosage est basée sur l'évaluation de la réduction du réactif d'Ellman par les groupes (SH) en formant l'acide 2-nitro-5- mercaptobenzoïque (figure 10).

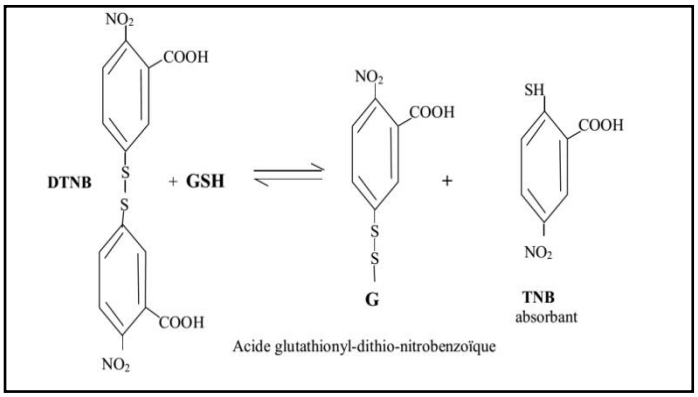


Figure 10: Principe de dosage du glutathion **(Ellman, 1959).**

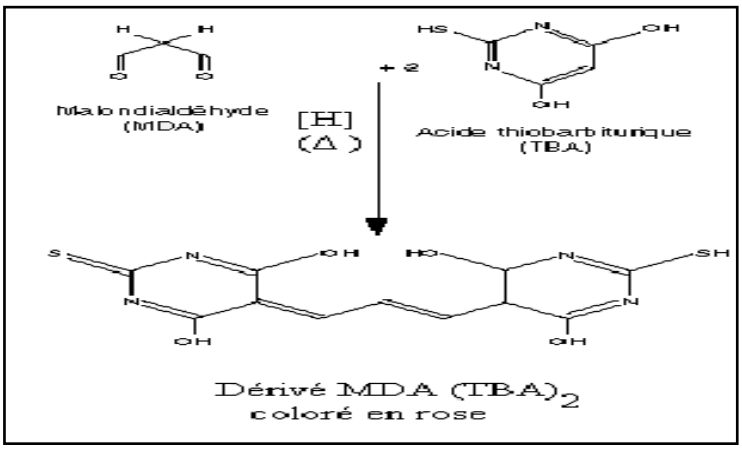
Procédure : Le glutathion a été dosé selon la méthode de **(Ellman, 1959)** avec quelques modifications. Brièvement, 2ml de tampon phosphate à pH : 8 a été mélangé avec 50 µl de la

fraction cytosolique et 20µl de réactif d'Ellman (le DTNB), après 15minuté d'incubation à la température ambiante, la lecture se fait à 412nm.

II-6- Estimation de la peroxydation lipidique

La peroxydation lipidique dans le foie et les reins a été évaluée par la quantification de malondialdéhyde (MDA) qui est un produit métabolique résultant de l'attaque des lipides membranaire (acides gras polyinsaturés) par les radicaux libres.

Le taux de la peroxydation lipidique dans les différents tissus, le foie et les reins a été estimé selon le procédé de **(Niehius and Samuelson, 1968)**. Le dosage du MDA repose sur la formation, en milieu acide et à chaud (100°C), entre une molécule du MDA et deux molécules d'acide thiobarbiturique (TBA), (figure 11), pour former un complexe coloré en rose absorbant à 535nm.



<u>Figure 11</u>: Principe du dosage du MDA **(Niehius and Samuelson, 1968).**

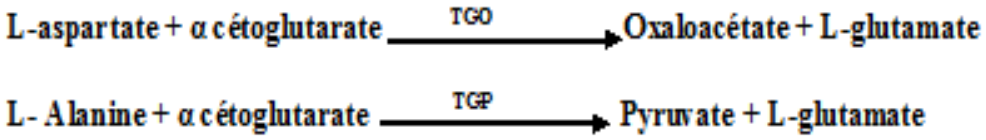
Procédure : Brièvement, 0.5 de l'homogénat a été traité par 2ml d'un réactif constitué de TBA 37%, TCA 15%, HCl 0.25N (1v, 1v, 1v), le mélange issu a été incubé dans un bain marie à 100°c pondant 15 min puis refroidi et centrifugé pondant 10 minute. L'absorbance de surnagent formé a été mesuré par un spectrophotomètre à 535nm **(Kalist and Leelavinothan, 2011)**.

II-7- Dosages biochimiques

II-7- 1-Le dosage des marqueurs enzymatiques (TGO, TGP)

Pour évaluer l'atteinte hépatique, les activités des transaminases TGO et TGP dans le sérum ont été dosées. Les transaminases sont des enzymes ayant une activité métabolique importante à l'intérieur des cellules hépatiques. Leur rôle est de transférer un groupe amine lors des nombreux processus chimiques qui se déroulent au niveau hépatique. Leur augmentation reflète une lésion

cellulaire, en particulier au niveau hépatique, cardiaque, rénal ou musculaire **(Clark *et al.* 2003).** Il y a deux transaminase dites glutamooxaloacétique TGO et glutamique pyruvique TGP, respectivement. Leur rôle est de transférer un groupe amine, composant des protéines, vers un acide cétonique lors des nombreux processus chimique qui se déroulent au niveau hépatique. Elles catalysent les réactions suivantes en présence du coenzyme phosphopyridoxal :



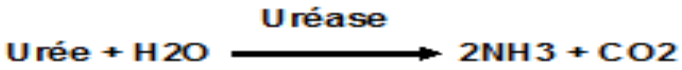
Le dosage du taux des transaminases par la méthode de **Reitman et collaborateur(1957)** dans le sang, a été effectué en utilisant des kits de Biomaghreb commerce par appareil multiparamétrique (automate de biochimie, Diam'S2300+ Mat Me DCO, 2008). Les résultats sont exprimés en UI/l.

II-7- 1- Dosage de créatinine sérique

La créatinine provient du métabolisme de la créatine musculaire et la quantité quotidienne produite est relativement constante. La mesure de la créatinine dans le sang est le test à utiliser pour une évaluation de base de la fonction rénale. La créatinine sérique est mesurée selon la méthode colorimétrique de Jaffe **(Bonsnes *et al.* 1945)** grâce à la formation d'un produit coloré en présence d'un picrate alcalin. La mesure est faite à l'aide d'un kit Biomaghreb au spectrophotomètre à 492 nm. La créatininémie est exprimée en mg /l.

II-7-2- Dosage d'urée

L'urée est dosée cinétiquement par la méthode de Berthelot modifiée(1859). Le principe de réaction c'est que les ions ammonium en présence de salicylate et d'hypochlorite de sodium réagissent en formant un composé de couleur verte (Dicarboxylindophenol) dont l'intensité est proportionnelle à la concentration en urée, selon la réaction suivante :



II- 8- Etude statistique

Les résultats numériques et graphiques ont été représentés sous forme de moyennes ± les écart-types. L'évaluation statistique est effectuée en comparant les moyennes des groupes traités par les métaux lourds à celles des groupes témoins. La signification de la différence entre le groupe

témoin et les autres groupes a été vérifiée en utilisant le test p de Student. La valeur trouvée par le calcul du p peut confirmer que les populations sont différentes avec un risque d'erreur *p* tel que :

- p > 0,05 = la différence n'est pas significative ns,
- 0,05 >p> 0,01 = la différence est significative *,
- 0,01> p> 0,001 = la différence est hautement significative **,
- p < 0,001 = la différence est très hautement significative ***.

Le calcul statistique est réalisé en utilisant le logiciel XLSTAT 2016.

Résultats et interprétation

III-Résultats et interprétation

III-1- Résultats de l'évaluation des différents paramètres du stress oxydant dans le foie et les reins

III-1-1-Evaluation de l'activité enzymatique de la catalase (CAT)

La variation de l'activité enzymatique de catalase (CAT) cytosolique dans le foie et les reins chez les souris exposées chroniquement au Pb, au Cd et à une mixture de Pb + Cd par voie orale pendant 6 mois, est représentée dans la figure 12.

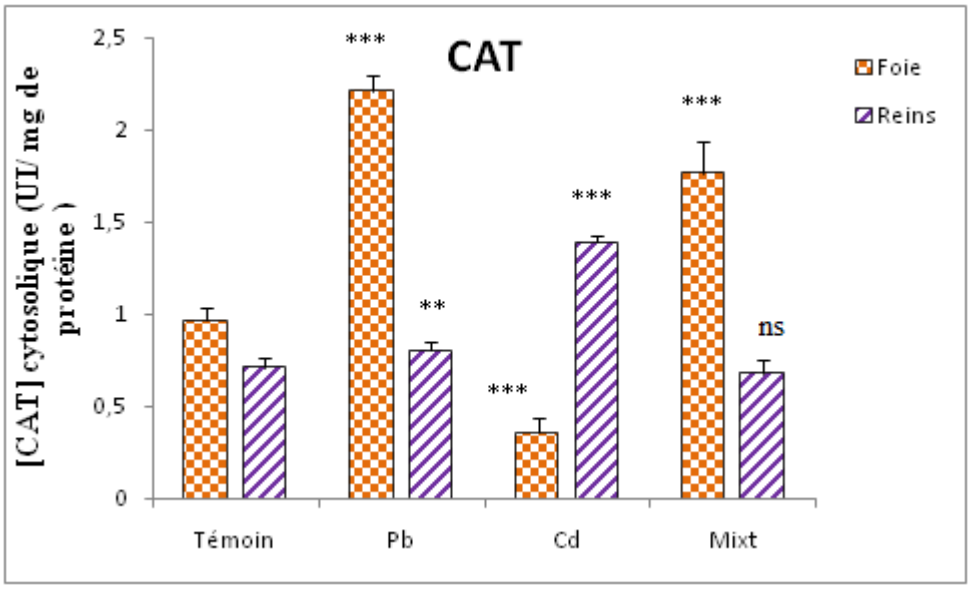


Figure 12 : Variation du taux de la catalase cytosolique chez les différents groupes de souris exposées aux métaux lourds.

Les résultats sont exprimés en moyenne ± écart type ; comparaison entre les groupes traité et le groupe témoin. N=6, Teste Student (ns) désigne un effet non significative (p > 0.05), (**) désigne un effet hautement significative (p < 0.01), (***) désigne un effet très hautement significative (p < 0.001).

L'activité enzymatique de la CAT hépatique augmente de façon très hautement significative *(p < 0.001)* chez les groupes traités par le Pb et la mixture avec des valeurs de (2.21 ± 0.08 UI/mg ; 1.76 ± 0.16 UI/mg) respectivement et une diminution très hautement significative *(p < 0.001)* chez le groupe traité par le Cd avec une valeur de (0.35 ± 0.07 UI/mg) en comparaison avec le groupe témoin (0.96 ± 0.07 UI/mg).

La variation du taux de la catalase cytosolique rénale est hautement significative *(p < 0.01)* chez le groupe recevant le Pb avec une valeur de (0.801 ± 0.04 UI/mg), une augmentation très hautement significative (*p < 0.001)* chez le groupe traité par le Cd (1.39 ± 0.03 UI/mg) par contre chez le lot

exposé à la mixture, nous constatons une variation non significative *(p > 0.05)*, (0.67 ± 0.07 UI/mg) par rapport au groupe témoin (0.712 ± 0.05 UI/mg).

III-1-2- Estimation de l'activité de la glutathion-S- transférase (GST)

La variation du taux du GST cytosolique dans le foie et les reins après administration prolongée du Pb, du Cd et de la mixture par voie orale pendant 6 mois est représentée par la figure 13.

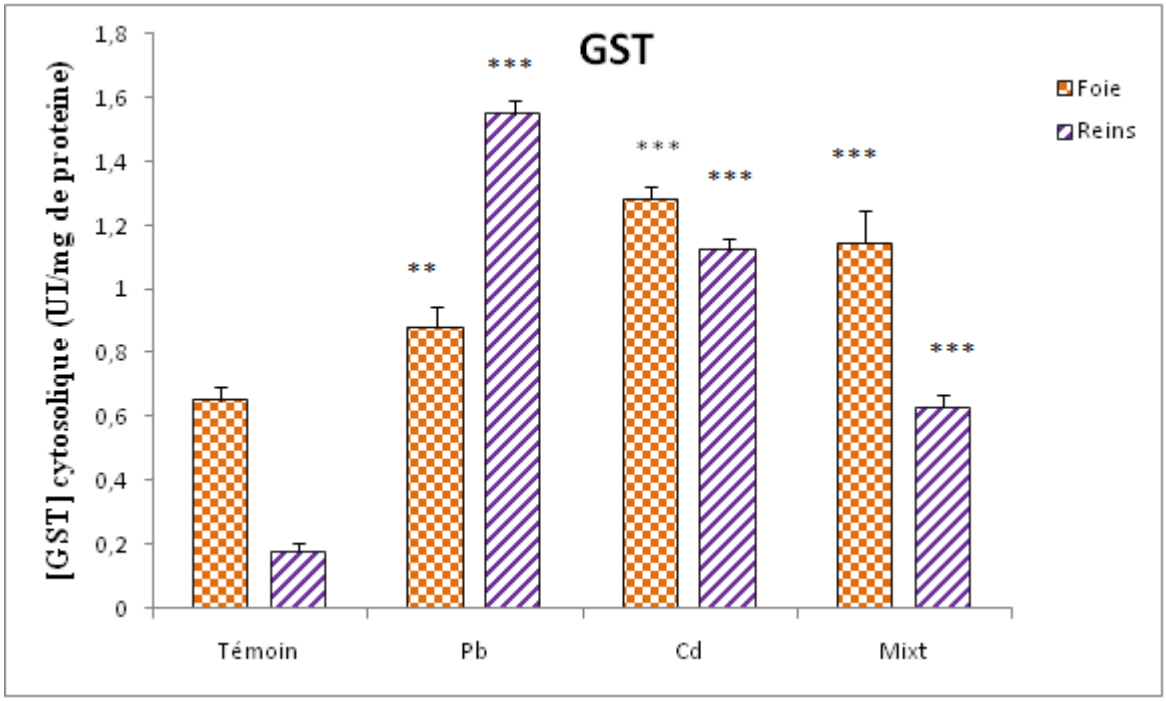


Figure 13: Variation du taux de GST cytosolique chez les différents groupes de souris exposées aux métaux lourds.

Les résultats sont exprimés en moyenne ± écart type ; comparaison entre les groupes traité et le groupe témoin. N=6, Teste Student (ns) désigne un effet non significative (p > 0.05), (**) désigne un effet hautement significative (p < 0.01), (***) désigne un effet très hautement significative (p < 0.001).

On constate une augmentation hautement significative (p < 0.01) du taux de GST cytosolique dans le foie chez le groupe contaminé par le Pb avec une valeur de (0.88 ± 0.06 UI/mg) et une augmentation très hautement significative chez les deux groupes traités par le Cd et la mixture (0.28 ± 0.04 UI/mg ; 1.14 ± 0.09 UI/mg) en comparaison avec le groupe témoin (0.65 ± 0 .03 UI/mg).

D'autre part, on remarque une augmentation très hautement significative du taux du GST cytosolique rénal chez les trois lots traités par le Pb, Cd et la mixture (1.55 ± 0.04 UI/mg ; 1.12 ± 0.03 UI/mg ; 0.63 ± 0.039 UI/mg) respectivement, par rapport au groupe témoin (0.18 ± 0.025 UI/mg).

III-1-3 Détermination du taux de glutathion réduit (GSH)

La variation du taux du GSH cytosolique dans le foie et les reins après administration prolongée du Pb, du Cd et de la mixture, par voie orale pendant 6 mois est représentée par la figure 14.

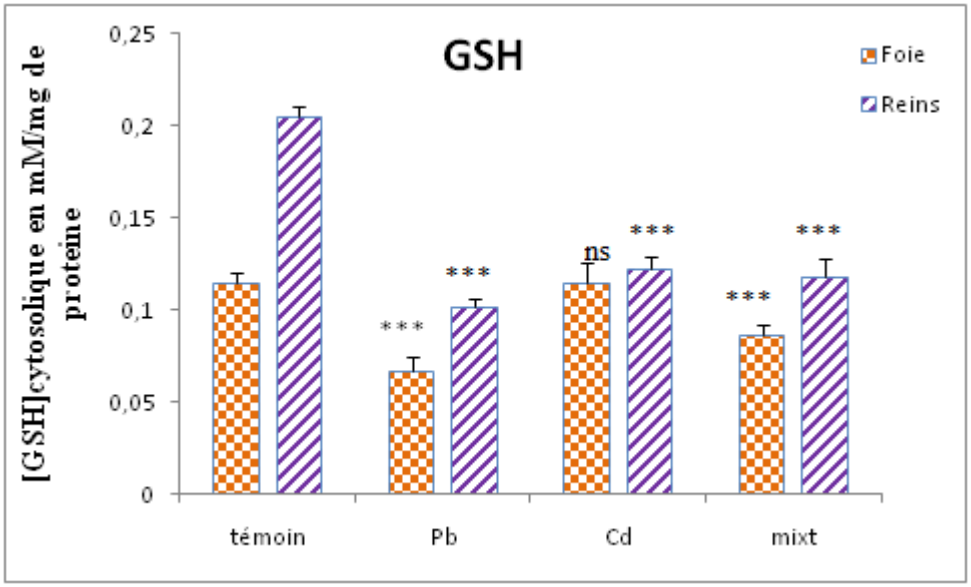


Figure 14: Variation du taux de GSH cytosolique dans le foie et les reins chez les différents groupes de souris exposés aux métaux lourds.

Les résultats sont exprimés en moyenne ± écart type ; comparaison entre les groupes traité et le groupe témoin. Teste Student (ns) désigne un effet non significative (p > 0.05), (***) désigne un effet très hautement significative (p < 0.001).

Cet histogramme montre une diminution très hautement significative *(p < 0.001)*du taux de GSH hépatique chez les groupes traités par le Pb (0. 06 ± 0.008 mmol/mg) et une légère augmentation du taux de GSH hépatique non significative (*p > 0.05*)chez le groupe exposé au Cd avec une valeur de (0 .11 ± 0.01 mmol/mg), ainsi une diminution de taux du GSH très hautement significative *(p < 0.001)* chez les groupes traités par un mélange de Pb et Cd (0.08 ±0 .005mmol/mg) par rapport au groupe témoin (0.11 ± 0.005 mmol/mg).

En revanche, on remarque aussi une diminution très hautement significative (p < 0.001) du taux de GSH rénal chez les trois groupes traités par le Pb, Cd et la mixture (0.101 ± 0.004 mmol /mg ; 0.122 ± 0.007 mmol /mg et 0.118 ± 0.010 mmol /mg) respectivement en comparaison avec le groupe témoin (0.0205 ± 0.005 mmol /mg).

III-1- 4 - Estimation de la peroxydation lipidique (MDA cytosolique)

Les résultats de variation du taux du MDA cytosolique dans le foie et les reins après administration prolongée au Pb, au Cd et à la mixture par voie orale pendant 6 mois sont représentés dans la figure 15.

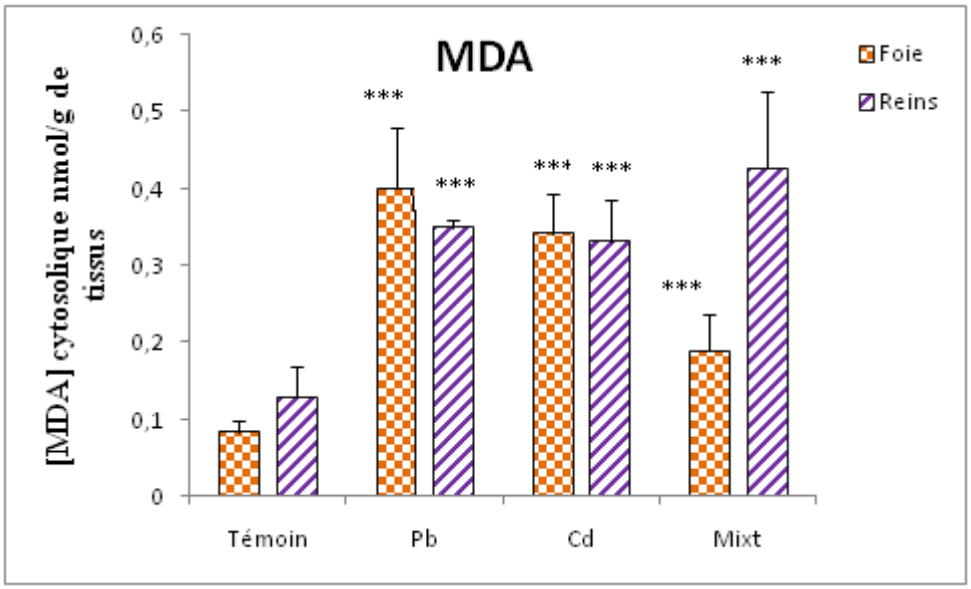


Figure 15 : Variation de MDA cytosolique dans le foie et les reins chez les différents groupes de souris exposées aux métaux lourds.

Les résultats sont exprimés en moyenne ± écart type comparaison entre les groupes traité et le groupe témoin. N=6, Teste Student (ns) désigne un effet non significative (p > 0.05), (***) désigne un effet très hautement significative (p < 0.001).

On constate une augmentation très hautement significative ($p < 0.001$) du taux de MDA issu de la peroxydation lipidique dans le foie chez les trois groupes d'animaux traitées par le Pb, Cd et la Mixture avec des valeurs respectives de (0.4 ± 0.078 nmol/mg ; 0.341 ± 0.05 nmol/mg et 0.19±0.046 nmol/mg), en comparaison avec le groupe témoin (0.08 ± 0 .015 nmol/mg).

D'autre part, on remarque une augmentation très hautement significative du taux de MDA cytosolique rénal chez les trois lots traités par le Pb, Cd et la mixture avec les valeurs respectives (0.35 ± 0.008 nmol/mg ; 0.33 ± 0.05nmol/mg ; 0.42 ± 0.09 nmol/mg), par rapport au groupe témoin (0.13 ± 0.038 nmol/mg).

III - 2 - Résultats de l'évaluation des paramètres biochimique du sang

La variation de la concentration sérique de l'urée, de créatinine et des transaminases (TGP, TGO) dans le foie et les reins après administration orale prolongée du Pb, du Cd et de la Mixture, pendant 6 mois, est représentée dans le tableau 2.

Tableau02 : Variation des paramètres biochimiques du sang chez les différents groupes de souris exposées aux métaux lourds.

Paramètres / Groups	TGO Ul /l	TGP Ul /l	Urée Ul /l	Créatinine Ul /l
Lot Témoin	95.2 ± 12, 05	52.77 ± 8.19	0,5 ± 0,064	6,5 ± 0,577
Lot Pb	413 ± 28.01***	151 ± 6,95***	0,436 ± 0,056ns	10,5 ± 0,5**
Lot Cd	164.21 ± 19.38***	68.2 ± 4.22*	0,575 ± 0,005*	34,75 ± 0,5***
Lot Mixt	241,83 ± 19.31***	133.5±24.98***	0,432 ± 0,033ns	28,25 ± 1,7**

La variation de la concentration sérique d'urée, de la créatinine et des transaminases (TGP, TGO) chez les souris témoins, les traités par le Pb, Cd et le Mixture, les valeurs sont exprimées en moyennes ± écart type. Teste Student (ns) désigne un effet non significative (p > 0.05), (*) désigne un effet significative (p < 0.05), (**) désigne un effet hautement significative (p < 0.01), (***) désigne un effet très hautement significative (p < 0.001).

Les résultats obtenus dans notre travail (tableau 02) ont montré une augmentation très hautement significative de TGO plasmatique *(p < 0.001)* chez les trois lots des souris traités par le Pb, Cd et la Mixture avec les valeurs de (413 ± 28.01 Ul /l ; 164.21 ± 19.38 UI/l et 241,83 ± 19.31 UI/l), respectivement, en comparaison avec le groupe témoin (95.2 ± 12.05 UI/l).

D'autre part, nous avons enregistré une augmentation très hautement significative *(p < 0.001)*, du taux de TGP sérique chez les souris traitées par le Pb (151 ± 6.95 Ul /l) et une légère augmentation significative *(p < 0.05)*, chez les groupes traités par le Cd (68.2 ± 4.22 Ul /l) et également une augmentation très hautement significative (*p < 0.001)*, chez les groupes traité par la Mixture (133,5 ± 24.98 Ul /l) par rapport aux groupes témoins (52.77 ± 8.19 UI/l).

Les résultats du tableau 02 montrent aussi une augmentation significative (*p < 0.05)* du taux d'urée sérique, chez les souris traitées par le Pb (0,575 ± 0,005 Ul /l) et une variation non significative *(p > 0.05)* chez les souris traités par le Cd et la Mixture (0,436 ± 0,056Ul /l ; 0,432 ± 0,033 Ul /l) en comparaison avec le groupe témoin (0,5 ± 0,064 Ul /l).

Par ailleurs, les résultats de la présente étude montre une augmentation très hautement significative *(p < 0.001)* chez les souris recevant du Cd (10,5 ± 0,5 Ul /l) et une augmentation hautement significative de la concentration sérique en créatinine *(p < 0.01)* chez les groupes traités par le Pb et la Mixture (;(34,75 ± 0,5 Ul /l ; 28,25 ± 1,7 Ul /l) respectivement par rapport au groupe témoin (6,5 ± 0,577 Ul /l).

Discussion

IV- Discussion

Les métaux lourds sont des redoutables polluants de l'environnement par leur capacité de déclencher ou d'amplifier les processus de production du stress oxydatif cellulaire, entrainant des pathologies dangereuses pour la santé publique telles que l'insuffisance rénale et hépatique (**Agrwal, 2014)**. Plusieurs travaux ont montré que le stress oxydant est potentialisé par la présence de taux élevés de ces métaux lourds dans le foie et le rein **(Belli *et al*. 2009)** et qui serait responsable d'une perturbation de l'activité d'une série d'enzymes telles que la CAT et GST et la variation de la teneur cellulaire en GSH, ainsi qu'une peroxydation lipidique accrue **(Tarasub *et al*. 2011)**. Dans cette présence étude, une évaluation *in vivo* de l'effet du Plomb, du Cadmium et leur mixture sur le foie et les reins a été effectuée chez des souris exposées pendant 6 mois à des micro-doses. Les résultats de cette étude ont illustré bien l'apparition des altérations du statut redox dans les cellules hépatiques et rénales accompagnées d'une perturbation de leur fonction suite à cette exposition chronique.

IV-1- Effet des métaux lourds sur le foie

IV-1-1- Altération du statut redox cytosolique

La génération des espèces réactives de l'oxygène (ROS) fait partie du métabolisme normal de la cellule, la chaine de transport des électrons dans la mitochondrie et les lysosomes génèrent ces espèces de manière systématique **(Nohl *et al*. 2004)**. Par contre, lors d'une exposition chronique aux métaux lourds (Pb et Cd) chez les animaux, il se crée un déséquilibre entre la génération des ROS et la production des antioxydants dans le foie. Les résultats de notre étude confirment ce déséquilibre où nous constatons une diminution significative du taux de GSH hépatique cytosolique chez les groupes traités par le plomb et la mixture. Le GSH constitue un système antioxydant non enzymatique de première défense en se liant par sa fonction SH aux métabolites toxiques, cela peut expliquer la diminution importante du taux de GSH hépatique cytosolique par la présence d'une affinité particulière entre les deux métaux toxiques et les groupements SH du glutathion réduit ce qui peut déséquilibrer la balance de sulfure cellulaire **(Belli *et la*. 2009 ; Attia *et al*. 2013). Flora et ces collaborateurs (2012),** ont signalé dans leur travaux qu'il y a la possibilité l'épuisement du taux de GSH, sous l'influence du plomb par l'inhibition des enzymes qui entrainent dans le cycle de métabolisme de GSH glutathion peroxydase GP_X, glutathion réductase GR et y-GCS (y-glutamyl cystéine- synthétase) **(Flora *et al*. 2012).**

Dans notre étude, nous avons enregistré une augmentation de l'activité enzymatique de la GST d'une manière très hautement significative dans le cytosol hépatique suite à l'exposition chronique

au Pb, au Cd et à leur mixture. L'élévation de cette activité pourrait être due en fait que les hépatocytes développent une réponse adaptative au stress oxydatif induit par ces deux métaux suite à leur expression génétique ce qui conduit à l'augmentation du taux du GST au niveau des cellules hépatique **(El-Shenawy, 2010 ; Madejczyk *et al*. 2015)**.

La CAT est une enzyme antioxydant qui catalyse la conversion de H_2O_2 en O_2 et H_2O **(Cheng *et al*. 2014)**. Elle est fortement exprimée dans le foie **(Liu *et al*. 2009)**. Nous avons signalé dans cette présente étude une augmentation très hautement significative de la CAT cytosolique hépatique dans les groupes traités par le Plomb et la mixture par rapport au groupe témoin. L'activité élevée de cette enzyme peut être due à une réponse adaptative liée à l'expression accrue de cette enzyme **(Sharma *et al*. 2005)**. En effet les systèmes cellulaires sont susceptibles de développer une large gamme d'antioxydants, comme moyens pour lutter contre l'accumulation dangereuse des radicaux libres dans le foie, des exemples comprennent l'expression accrue des enzymes de détoxification des ROS, comme la catalase et les peroxyde dismutase qui sont le résultat de cette adaptation (**Jacquelyn *et al.* 2005).** D'autre chercheurs ont apporté des résultats compatibles avec ceux obtenus dans cette présente étude où l'exposition chronique des nouveaux nés du rat *Wistar* à travers une exposition périnatale aux Cd et Pb des mamans gestantes, où l'activité de la catalase est améliorée, permettant au cerveau d'élever son pouvoir de détoxification **(Antonio *et al.* 2003).**

Par contre les résultats de notre étude montrent que l'exposition chronique des souris au Cd donne une diminution très hautement significative de l'activité catalasique dans le cytosol hépatique. En effet, la production accrue du peroxyde d'hydrogène peut dépasser la capacité antioxydante de la CAT et la production intense de H_2O_2, pouvant ainsi inhiber son activité **(Atli *et al*. 2006),** ce qui explique la diminution importante de l'activité du catalase cytosolique chez le groupe traité par le Cd. De plus, cette diminution peut être une conséquence de la diminution de l'activité de la SOD grâce aux effets exercés par le Cd par l'intermédiaire de la voie SIRT3/ SOD2 **(Pi *et al.* 2015).** La diminution de H_2O_2 peut diminuer l'activité de la CAT. En outre, une carence dans la disponibilité en cofacteurs Cu^{++} et Zn^{++} pourrait diminuer l'activité enzymatique de la SOD cytosolique **(Zhai *et al*. 2015).**

Les résultats de notre étude ont montré une production excessive du MDA, enregistrée chez les groupes traités par le Pb, le Cd et la mixture. La teneur élevée du cytosol en MDA est un indicateur d'une peroxydation lipidique initiée par la présence des ROS notamment l'anion hydroxyle qui attaque les doubles liaisons des acides gras composant les lipides membranaires. Ces résultats sont soutenus par les travaux de **Sharma et ces collaborateurs (2011)** qui ont démontré l'existence d'une corrélation entre l'exposition à ces deux métaux lourds et la production du MDA. Par ailleurs,

d'autres travaux ont montré qu'après une coexposition de Pb et de Cd, il y a de grave altération du statut redox de la cellule hépatique, se traduisant par une surproduction des ROS **(Belli *et al*. 2009).**

De plus, Les peroxydes de lipide inactivent des constituants cellulaires par le stress oxydant en subissant une réaction en chaîne radicalaire menant finalement à la perte d'intégrité membranaire ou d'oxydation (**Attia *et al*. 2013 ; Agrawal *et al*. 2014).** L'attaque des acides gras polyinsaturés des lipides par ces ROS constitue le processus de fond de la déformation membranaire et la croissance de la perméabilité membranaire qui induit finalement une altération irréversible du fonctionnement de la cellule pouvant aller jusqu'à la lyse cellulaire ou l'apoptose.

IV-1-2- Dysfonctionnement hépatique

IV-1-2-1- Augmentation du taux des transaminases (TGO et TGP)

Les résultats de cette présente étude montrent une augmentation très hautement significative de l'activité enzymatique des transaminases sériques (TGO et TGP) des souris traités chroniquement par le Pb, le Cd et la mixture. L'augmentation de ces enzymes indique une lésion hépatique s'expliquant par la fuite de ces enzymes hépatocytaires vers le plasma via la perforation engendrée par l'altération de la perméabilité membranaire causé par le processus de la peroxydation lipidique accrue résultant du stress oxydatif **(Attia *et al*. 2013 ; Orabi *et al*. 2013 ;)**. Ces résultats sont en accord avec les travaux de **Uyanik et ces collaborateur (2001) ; Pari and Murugavel (2005)** chez les rats qui ont déclaré l'augmentation anormale de ces enzymes dans leur sang.

IV-2- L'effet des métaux lourds sur les reins

IV-2-1- L'altération du statut redox cytosolique rénal

Au niveau rénal, les résultats obtenus dans cette étude ont signalé une augmentation considérable de l'activité enzymatique de la CAT et de la GST après exposition chronique à ces deux métaux (Pb et Cd). Cette élévation suggère une augmentation excessive de la formation des ROS, ce qui peut stimuler l'activité de la CAT et la GST pour faire face aux dommages rénaux résultant de cette augmentation et pour la désintoxication causé par ces deux métaux **(Orabi *et al.* 2013 ; Vottelerd *et al*. 2015).**

En revanche, lors d'un traitement des animaux par les deux métaux lourds (Pb et Cd), le taux du GSH a nettement diminué suite à son action de neutralisation des radicaux libres générés par le Pb et le Cd **(Hansen *et al.* 2006)**. Aussi le GSH est considère comme un transporteur de Cd au niveau de tubule proximal rénal par la présence d'une affinité entre le Cd et les groupements thiols de GSH, cette affinité à été associé à l'accumulation haut de ce métal dans les cellules épithélial rénal

par la formation des complexes Cd-GSH qui résulte à sont tour la réduction du taux du GSH **(Vottelerd *et al*. 2015).**

L'évaluation de l'effet des métaux lourds sur la peroxydation lipidique au niveau rénal montre une augmentation proportionnelle du taux de MDA cytosolique rénal (**Tarasub *et al*. 2011)**. Une production élevée des ROS attaquent les acides gras polyinsaturés de la membrane cytoplasmique des cellules épithéliales rénales. Le rôle du plomb et du cadmium dans la surproduction du MDA a été signalé par plusieurs auteurs **(Lopez *et al*. 2006 ; Patra *et al*. 2011)**.

IV-2-2- Evaluation de la fonction rénale

Les résultats de cette étude montrent que l'administration de plomb, de cadmium et de la mixture par voie orale augmente de façon significative la concentration sérique de créatinine et une augmentation significative d'urée sérique. L'augmentation du taux sérique de l'urée et de la créatinine est considérée comme un biomarqueur de la dysfonction rénale et les dommages rénaux provoqués par le Pb et le Cd. L'urée et la créatinine sont des paramètres essentiels pour évaluer la fonction de la filtration glomérulaire **(Finco, 1997 ; Saka *et al*. 2011 ; Annabi *et al*. 2015).** De plus, l'augmentation de l'urée dans le sérum est corrélée avec l'augmentation de catabolisme protéique, les protéines peuvent être dégradées en acide amine puis en urée et créatinine. Quoique nous n'ayons pas évalué les protéines sériques dans notre étude, l'augmentation de l'urée et de la créatinine renvoient à l'idée de l'insuffisance rénale dans l'excrétion de ces deux déchets du métabolisme protéiques, ces résultats corrèlent bien avec les travaux de **EL-Demerdash et ces collaborateurs (2009)** qui ont montré également l'augmentation de ces deux indicateurs de la néphrotoxicité induite par le Pb et le Cd**.**

Conclusion et perspectives

Les résultats de cette étude montrent clairement que la contamination par les métaux lourds en l'occurrence le Plomb et le Cadmium provoquent l'apparition d'un déséquilibre du statut redox en faveur du stress oxydatif dans le cytosol des cellules hépatiques et rénales. Ce déséquilibre est responsable de l'affaiblissement des systèmes antioxydants et la réduction du potentiel de détoxification, mettant en risque la fonction et l'intégrité de ces cellules qui se résume par les points suivants :

- Une augmentation du taux de MDA cytosolique.

- Une diminution du taux du glutathion réduit (GSH).

- Une forte perturbation des enzymes antioxydantes, la CAT et la GST.

- Une perturbation des paramètres biochimiques hépatiques TGO, TGP et la fonction excrétrice rénale (la créatinine et l'urée).

A la fin de cette étude, il faudrait envisager en perspective d'autres études qui permettront une évaluation plus profonde de l'impact de ces métaux sur l'organisme portée notamment sur les effets proapoptotique et épigénétique des métaux lourds au niveau des différents organes de la grande fonction biologique à des doses réelles afin de mettre en évidence l'étiologie de certaines maladies telles que les cancers, retard de croissance et les déficiences neurocomportementales chez les enfants.

Par mesure préventive, il est recommandé de ne pas consommer l'eau du barrage de Beni Haroun à cause de sa teneur élevée en Cd et Pb à des concentrations toxiques.

Références bibliographiques

Achour S., Iken I., Amarti A., 2014. Les intoxicationspar les métaux lourds. Toxicologie Maroc, Publication officielle du Centre Anti Poison du Maroc, 21 :1-15.

Adams D. H., Ju C., Ramaiah S. K., Uetrecht J., Jaeschke H., 2010. Mechanisms of Immune Mediated Liver Injury. Toxicological Sciences, 115(2):307–321.

Agrawal S., Flora G., Bhatnagar P., Flora S. J. S., 2014. Comparative oxidative stress, metallothionein induction and organ toxicity following chronic exposure to arsenic, lead and mercury in rats.Cell. Mol. Biol., 60 (2):13-21.

Al-Attar A. M., 2011. Vitamin E attenuates liver injury induced by exposure to lead, mercury, cadmium and copper in albino mice. Saudi Journal of Biological Sciences, 18: 395–401.

Alexander J., Frei M., Frei B., 2013. Myths, Artifacts, and Fatal Flaws: Identifying Limitations and Opportunities in Vitamin C Research. Nutrients, 5: 5161-5192.

Alian V., Alian B., Toxicologie. Lavoisier. Paris. 2 éme édition, 2005.p: 601.

Amamou F., Nemmiche S., Meziane R. k., Didi A., Yazit S. M., Chabane S. D. 2015. Protective effect of olive oil and colocynth oil against cadmium-induced oxidative stress in the liver of Wistar rats. Food and Chemical Toxicology.78:177-84.

Ambily R. N., Olivier D., Karen S. , Emmy V. K., Cuypers A., 2013. Cadmium-Induced Pathologies: Where Is the Oxidative Balance Lost (or Not)?, Int. J. Mol., 14: 6116-6143.

Annabi A., Dhouib B. I., Lasram M., Gharbi N., El Fazâa S., 2015. Oxidative stress, biochemical alterations, and hyperlipidemia in female rats induced by lead chronic toxicity during puberty and post puberty periods. Iran J Basic Med Sci, 18:1034-1043.

Antonio M. T., Corredor L., Leret M. L., 2003. Study of the activity of several brain enzymes like markers of the neurotoxicity induced by perinatal exposure to lead and/or cadmium. Toxicology Letters, 143: 331- 340.

Atli G. A., Alptekinl O., Tuke S., Canli M., 2006. Response of catalase activity to Ag+, Cd2+, Cr6+, Cu2+ and Zn2+ in five tissues of freshwater fish Or eochromis niloticus. Comp. Biochem. Physiol, 143: 218-224.

Attia A. M. M., Ibrahim F. A. A., Nabil G. M., Aziz S.W., 2013. Antioxidant effects of ginger (Zingiber officinale Roscoe) against lead acetate-induced hepatotoxicity in rats. African journal of pharmacy and pharmacology, 7(20): 1213-1219.

Aurousseau B., DurandD., Gruffat D., 2004. Contrôle des phénomènes oxydatifs pendant la gestation chez les monogastriques et les ruminants. Productions Animales, 17(5): 339-354.

Baudin B., 2006. Stress oxydant et pathologies cardiovasculaires. mtcardio (mtc), 2(1): 43-52.

Belli N., Lahouel M., Chebab S., Tekouk M., Leghouchi E., 2009. Stress oxydant induit par la coexposition au plomb et au cadmium : deux contaminants des eaux souterraines de Oued Nil (Jijel - Algérie).Water Science, 23(3) : 289-301.

Berroukche A., Slimani M., Kahloula K., Kafi H., Cheikh A., 2014. Evaluation de l'activité du cadmium, en présence du zinc, sur les structures des tissus régulateurs du métabolisme chez le rat Wistar. Int. J. Biol. Chem. Sci., 8(4): 1796-1807.

Bismuth C., Baud F., Conso F., Dally S., Fréjaville J.P., Garnier R., Jaeger A., 2000. Toxicologie clinique ; Flammarion Médecine-Sciences, Paris, 5ème édition. p: 21-36.

Bradford M. M., 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding.Ann Biochem., 72: 248–252.

CEE (Communauté Economique Européenne), In : Levret D., Lehen A., Sandrine J., Mouchelin J., Berly A., 2008. Guide pratique des substances toxiques dans les eaux douces et littorales du bassin Seine-Normandie, éditions AESN, p : 97.

Chade A.R., 2013. Renal Vascular Structure and Rarefaction. NIH Public Access Author Manuscript, 3(2):817–831.

Cheng P., Xiaobo W., Jingnan C., Rui J., Lijun W., YukMan L., Yuanyuan Z., Yuwei L., Lin L., Ying M. K., Yu H., Zhen-Yu C., 2014. Biology of Ageing and Role of Dietary Antioxidants. BioMed Research International, Volume 2014:13 pages.

Chiarelli R., Roccheri M. C., 2012. Heavy Metals and Metalloids as Autophagy Inducing Agents: Focus on Cadmium and Arsenic.Cells, 1: 597-616.

Cho M. R., Kang H.G., Jeong H. S., Cho M. H., 2010. Time-dependent Changes of Cadmium and Metallothionein after Short-term Exposure to Cadmium in Rats**.** ToxicolRes. 26: 131-136.

CIREI (Cellule Inter Régionale d'Epidémiologie et d'Intervention), 2001. Dépistage du saturnisme infantile autour des sources industrielles de plomb. Organisation des programmes de dépistage et évaluation de l'efficacité des mesures de réduction et de l'exposition. Tom2. p175.

Claiborne A., 1985. Catalase activity In CRC, Handbook of Methods for Oxygen Radical Research (Ed. RA Greenwald) CRC Press.Boca Raton, FL., 283-284.

Clark J. M., Brancati F. L., Diehl A. M., 2003. The Prevalence and Etiology of Elevated Aminotransferase Levels in the United States. Am. J. Gastroenterol., 98(5):960-970.

Cobbina S. J., Chen Y., Zhou Z., Wu X., Feng W., Wang W., Guanghua M., Xu H., Zhang Z., Wu X., Yang L., 2015. Low concentration toxic metal mixture interactions: Effects on essential and non-essential metals in brain, liver, and kidneys of mice on sub-chronic exposure. Chemosphere, 132: 79–86.

Cuypers A., Plusquin M., RemansT. , Jozefczak M., Keunen E., Gielen H., Opdenakker K., Nair A.R., Munters E., Artois T. J., 2010. Cadmium stress: An oxidative challenge Biometals. 23: 927–940.

Dröge W., 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. Physiol Rev, 82: 47-95.

EFSA (European Food Safety Authority). Guidance on Default assumptions used by the EFSA Scientific Panels and Committee, and EFSA Units in the absence of actual measured data, **2011**, p:1-30.

Elaine N. M., Biologie humaine. Person. 2éme édition, 2008, France.p : 547.

El-Demerdash F. M., Yousef M. I., Radwan F. M. E., 2009. Ameliorating effect of curcumin on sodium arsenite - induced oxidative damage and lipid peroxidation in different rat organs. Food and Chemical Toxicology, 47: 249–254.

Ellman G. L., 1959. Tissue sulfhydryl groups. Arch BiochBiophys., 74: 214-226.

El-Shenawy N. S., 2010. Effects of insecticides fenitrothion, endosulfan and abamectin on antioxidant parameters of isolated rat hepatocytes.Toxicology in Vitro, 24:1148–1157.

Falcy M., Jargot D., La Rocca B., Pillière F., Robert S., Serre P., 2016. Cadmium et composés minéraux. 60 :1-19.

Favier A., 2003. Le stress oxydant : Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. L'actualité chimique, 108 -115.

Finco, D. R., 1997. Kidneyfunction. In: Kaneko, J.J., Harvey, J.W., Bruce, M.L.Clinical Biochemistry of Domestic Animals. Academic press, San Diego, California. 462 - 478.

Flora G., Gupta D., Tiwari A., 2012. Toxicity of lead. Interdiscip. Toxicol. 5(2): 47–58.

Frank C. L., Toxicologie : données générales, procedures d'évaluation, organes cibles, evaluation du risque, Masson. paris.2éme édition, 1992. P 300- 301.

Garnier R., Langrand J., Carré N., 2013. Effets du plomb sur la santé, lorsque la plombémie est inférieure à 100 µg/L. JRVS Ile-de-France, 2013 :1- 18.

Gérard G.T., Bryan D., 2009. Manuel d'anatomie et physiologie humains, science médicales. France. p: 482-483.

Gillis B. S., Arbieva Z., Gavin I. M., **2012.** Analysis of lead toxicity in human cells. BMC Genomics.13:344.

González J., Valls N., Brito R., Rodrigo R., **2014.** Essential hypertension and oxidative stress: New insights. World J Cardiol, 6(6):353-366.

Grara N., Boucenna M., Atailia A., Berrebbah H., Djebar M. R., 2012. Stress oxydatif des poussieresm_etalliques du complexe sid_erurgique d'Annaba (Nord-Est alg_erien) chez l'escargot Helixaspersa. Environ Risque Sante, 11: 221-9.

Greco M., Chiappetta A., Bruno L., Bitonti M. B., 2012. In Posidoniaoceanica cadmium induces changes in DNA methylation and chromatin patterning. Journal of Experimental Botany, 63: 695–709.

Gregory M., Tuan D. N, Benoit P, 2015. Modified Electrodes Used for Electrochemical Detection of Metal Ions in Environmental Analysis. Biosensors, 5:241-275.

Habig W. H., Pabst M. J., Jakoby W. B., 1974. Glutathion**e**-S-transferase: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. J Biol Chem., 249: 7130-7139.

Habuka M., Fagerberg L., Hallstrom B. M., Kampf C., Edlund K., Sivertsson A., Yamamoto T., Pontén F., Uhlén M., Odeberg J., 2014. The Kidney Transcriptome and ProteomeDefined by Transcriptomics and Antibody Based Profiling. PLOS ONE, 9(12):1-19.

Hansen J. M., Zhang H., Jones D. P., 2006. Differential oxidation of thioredoxin-thioredoxin-2, and glutathione by metal ions. Free Radical Biology et Medicine 40:138-45.

Hartwig A., 1994. Role of DNA Repair Inhibition in Lead- and Cadmium-induced Genotoxicity. Environmental Health Perspectives.102:1-6.

Hekimi S., Lapointe J., Wen Yang Y., 2011. Taking a "good" look at free radicals in the aging process. Trends Cell Biol., 21(10): 569–576.

Jacquelyn J. B., Stephen S. L., Xianglin S., 2005. Conference overview: Molecular mechanisms of metal toxicity and carcinogenesis. Molecular and Cellular Biochemistry 279: 3–15

Jacques P., Claude P., 2000. Toxicité des métaux. toxicology, 2000: 35–43.

Jalili S., Ilkhanipour M., Heydari R., Farshid A. A., Salehi S., 2007. The Effects of Vitamin E on Endosulfan - Induced Oxidative Stress in Rat Heart. Pakistan Journal of Nutrition. 6 (4): 375-380.

Johannes G., Franziska S., Christian G. S., Vera E., Paul B., Andrea R., Groneberg D., 2006. The toxicity of cadmium and resulting hazards for human health. BioMed Central, 1:22.

Kalist S., Leelavinothan P., 2011. Hesperetin, a citrus flavonone, protects potentially cadmium induced oxidative testicular dysfunction in rats 2011. Ecotoxicology and Environmental Safety, 74 : 2105–2111.

Kansal L., Sharma V., Sharma A., Lodi S., Sharma S. H., 2011. protective role of coriandrumsativum (coriander) extracts against lead nitrate induced oxidative stress and tissue damage in the liver and kidney in male mice. International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology, 2: 65- 83.

Klaassen D. C., Liu J., Diwan B. A., 2009. Metallothionein Protection of Cadmium Toxicity.ToxicolApplPharmacol., (3): 215–220.

Kupsco A., Schlenk D., 2015. Oxidative Stress, Unfolded Protein Response, and Apoptosis in Developmental Toxicity. Int Rev Cell Mol Biol., 317:1–66.

Lauwerys R., Dominique L., Toxicologie industrielle et intoxication professionnelles. Blog Elevier Masson. Paris, 3éme édition. 1990 p 293.

Lavallard V. J., Gual P., 2014. Autophagy and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. BioMed Research International, volume 2014, 13 pages.

Liu J., Qu W., Kadiiska B. M., 2009. Role of oxidative stress in cadmium toxicity and carcinogenesis. ToxicolApplPharmacol. 238(3): 209–214

Liu Y., Adachi M, Zhao S., Hareyama M., Koong A. C., Luo D., Rando T. A., Imai K., Shinomura Y., 2009. Preventing oxidative stress: a new role for XBP1 Cell Death Differ, 16(6): 847–857.

Lopez E., Aace C. M. J., Oset-Gasque M. J., Canadas .S, Gonzalez M.P., 2006. Cadmium induced reactive oxygen species generation and lipid peroxidation in cortical neurons in culture. Free Radic. Biol. Med., 40, 940-951.

Lü J., Lin, P. H., Yao, Q., Chen, C., 2010. Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: Experimental approaches and model systems. J. Cell Mod. Med, 14: 840-860.

Madejczyk M. S., Baer C. E., Dennis W. E., Minarchick V. C., Leonard S. S., Jackson D.A., Stallings J. D., Lewis J.A., 2015 . Temporal Changes in Rat Liver Gene Expression after Acute Cadmium and Chromium Exposure, PLoS ONE, 10(5): 127-327.

Maisons A., 2012. Valeur toxicologique de référence pour le cadmium et ses composés. Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail. 27: 1-86

Malaviya R., **Laskin J. D.**, **Laskin D. L., 2014**. Oxidative stress-induced autophagy: Role in pulmonary toxicity .Toxicol. Appl. Pharmacol., 275 (2): 145–151.

Marcel D., 2013. Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes.Biochimica et BiophysicaActa , 1830: 3217–3266.

Melila M. , Poutouli W., Amouzou K., Tchangbedji G., Tchaou M. , Doh A., Goto C., 2012. Induction du stress oxydatif chez l'homme suite à la bioconcentration des éléments traces métalliques (cadmium et plomb) par voie trophique à Kpémé (Sud du Togo). Int. J. Biol. Chem. Sci., 6(3): 1263-1270.

Messner B., Türkcan A., Ploner C., Laufer G., Bernhard G., 2016. Cadmium overkill: autophagy, apoptosis and necrosis signalling in endothelial cells exposed to cadmium**.** Cell Mol Life Sci., 73: 1699–1713.

Michels A. J., Frei, 2013. Myths, Artifacts, and Fatal Flaws: Identifying Limitations and Opportunities in Vitamin C Research. Nutrients, 5: 5161-5192.

Morin G., 1999. Determination of de chemical from lead in smelter contaminated soils, Importance of adsorption process. American mineralogist, 84: 420-434.

Morin Y., 2006. Larousse médical. édition2003, Pris.

Niehius W. G., Samuelson B., 1968. Formation of malondialdhyde from phos-pholipidarachidonate during microsomal lipid peroxidation. Eur. J. Biochem, 6: 126–130.

Nohl H., Gille L., Staniek K., 2004. The mystery of reactive oxygen speciesderived from cell respiration. Biochemical Society Transactions 51: 223 - 229.

Orabi S. H., Elbialy B. E., Shawky S. M., 2013. Ameliorating and Hypoglycemic Effects of Zinc against Acute Hepatotoxic Effect of Chlorpyrifos.Global Veterinaria, 10 (4): 439-446.

Pal P.B., Sinha K., Sil P.C., 2013. Mangiferin, a Natural Xanthone, Protects Murine Liver in Pb(II) Induced Hepatic Damage and Cell Death via MAP- Kinase, NF-kB and Mitochondria Dependent Pathways. PLoS ONE, 8(2):1-17.

Pari L., Murugavel P., 2005. Role of diallyltetrasulfide in ameliorating thecadmium induced biochemical changes in rats. Environ. Toxicol. Pharmacol., 20: 493-500.

Parma I., 2011. Guidance on Default assumptions used by the EFSA Scientific Panels and Committee, and EFSA Units in the absence of actual measured data EFSA Scientific Committee, European Food Safety Authority, 2011: 1-30.

Patra R. C., Amiya K. Rautray, Swarup D., 2011. Oxidative Stress in Lead and Cadmium Toxicity and Its Amelioration**.** Veterinary Medicine International, Volume 2011: 9.

Patri M., Padmini A., Phanithi P. B., 2009. Polycyclic aromatic hydrocarbons in air and their neurotoxic potency in association with oxidative stress: A brief perspective, Annals of Neurosciences, 16: 10.

Pi H., Xu S., Reiter R. J., Guo P., Zhang L., Li Y., Li M., Cao Z., Li T., Xie J., Zhang R., He M., Lu Y., Liu C., Duan W., Yu Z., Zhou Z., 2015 . SIRT3-SOD2-mROS-dependent autophagy in cadmium-induced hepatotoxicity and salvage by melatonin. Autophagy , 11: 1037-1051.

Poljsak B., 2011. Strategies for Reducing or Preventing the Generation of Oxidative Stress, Oxidative Medicine and Cellular Longevity, volume 2011:15 pages.

Prozialeck W.C., Joshua E. R., **2012.** Mechanisms of Cadmium-Induced Proximal Tubule Injury: New Insights with Implications for Biomonitoring and Therapeutic Interventions, pharmacology and experimental therapeutics , 343:2–12.

Reckziegel P., Dias V. T., Motter B. D., Boufleurb N., Barcelos R. C. S., Segatd H. J., Pase C. S., Santos C. M. M., Moraes F. É. M., Bürgerg M. E., 2016. Antioxidant protection of gallic acid against toxicity induced by Pbinblood, liver and kidney of ratsPatrícia. Toxicology Reports, 3: 351–356.

Redler R. L., Dokholyan N. V., 2012. The complex molecular biology of amyotrophic lateral sclerosis (ALS). ProgMolBiolTransl Sci., 107: 215-262**.**

Reitman S., Frankel S., Amer J. A., 1957. Colorimetric method for the determination of serum glutamic oxaloacetic and glutamic pyruvic transaminases. Am. J. Clin. Pathol, 28: 56–63.

Saka S., Bahi A., Aouacheri W., 2011. L'effet du stress oxydant induit par l'acétate de plomb sur le système enzymatique du glutathion chez les rats .Ann Toxicol Anal., 23(3): 139-145.

Salińska A., Włostowski T., 2011. Combined Effect of Dietary Cadmium andBenzo(a) pyreneonMetallothionein Induction and Apoptosis in the Liver and Kidneys of Bank Voles. Biol Trace Elem Res. 147:189–194.

Samuel J. B., Stanley J. A., Princess R. A., Shanthi P., Sebastian M. S., 2011. Gestational Cadmium Exposure-Induced Ovotoxicity Delays Puberty through Oxidative Stress and Impaired Steroid Hormone Levels. J. Med. Toxicol., 7: 195–204.

Satarug S., Haswell-Elkins M.R., Moore M. R., 2000. Safe levels of cadmium intake to prevent renal toxicity in human subjects. Br. J. Nutr., 84: 791–80.

Satarug S., Garrett S. H., Sens M. A., Sens D.A, 2010. Cadmium, environmental exposure, and health outcomes. Environ. Health Perspect: 118: 182–190.

Segal A. W., 2008. The function of the NADPH oxidase of phagocytes and its relationship to other NOXs in plants, invertebrates, and mammals. The International Journal of Biochemistry and Cell Biology, 40(4): 604-618.

Sharma V., Sharma S., Pracheta W., Sharma S., 2011. Lead induced hepatotoxicity in male swiss albino mice: the protective potential of the hydromethanolic extract of withaniasomnifera .International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research, 7: 116- 121.

Sharma Y., Bashir S., Irshad M., Gupta S. D., Dogra T. D., 2005. Effects of acute dimethoate administration on antioxidant status of liver and brain of experimental rats. Toxicology, 206: 49-57.

Sibernagl S., Despopoulos A., 1996. Physiologie. Médecine-Sciences Flammarion Médecine-Sciences, Paris, 2ème édition, p120-153.

Skipper A., Sims J. N. , Yedjou C. G. , Tchounwou P. B., 2016. Cadmium Chloride Induces DNA Damage and Apoptosis of Human Liver Carcinoma Cells via Oxidative Stress. Int. J. Environ. Res. Public Health, 13: 88.

Smith A. M., Schnellmann G. R., 2012. Calpains, mitochondria, and apoptosis. Cardiovascular Research. 96: 32–37.

Soazig L. L., Gilles, Martinez M. C., Ramaroson A., 2014. Oxidative Stress and Metabolic Pathologies: From an Adipocentric Point of View. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2014:18.

Son Y. O., **Wang X.**, **Hitro J. A.**, **Zhuo Z.**, **ChengS.**, **Budhraja A.**, **Ding S.**, **Lee J. C.**, **Shi X., 2011.** Cadmium induces autophagy through ROS-dependent activation of the LKB1-AMPK signaling in skin epidermal cells. ToxicolApplPharmacol, 255 (3): 287–296.

Tarasub N., Junseecha T., Tarasub C., AyutthayaW. D. T., 2012. Protective Effects of Curcumin, Vitamin C, or their Combination on Cadmium-Induced Hepatotoxicity**.** Journal of Basic and Clinical Pharmacy, 3: (9).

Tarasub N., Tarasub C., Devakul N. A. W., 2011. Protective role of curcumin on cadmium-induced nephrotoxicity in rats. Journal of Environmental Chemistry and Ecotoxicology, 3(2):17-24.

Umapathy A., Donaldson P., Lim J., 2013. Antioxidant Delivery Pathways in the Anterior Eye.Bio Med Research International, 2013: 10.

UyanikF., Eren M., Atasever A., Tuncoku G., Kolsuz A. H. 2001. Changes insome biochemical parameters and organs of broilers exposed to cadmium and effect ofZinc on cadmium induced alteration. Israel. Vet. Med. 56:128-134.

Vottelerd P. V., Anton Y., Salazar-Lugo R., 2015. Cadmium affects the mitochondrial viability and the acid soluble thiols concentration in liver, kidney, heart and gills of Ancistrus brevifilis (Eigenmann, 1920), Open Veterinary Journal, 5(2): 166-172.

Waalkes M. P., 2003. Cadmium carcinogenesis. Mutat. Res., 533:107-120.

Walter C. Edwards P., Edwards J. R., **2012.** Mechanisms of Cadmium-Induced Proximal Tubule Injury: New Insights with Implications for Biomonitoring and Therapeutic Interventions. pharmacology and experimental therapeutics, 343 (1): 2-12.

Wang K., 2015. Autophagy and apoptosis in liver injury. Cell Cycle, 14(11): 1631-1642.

Yang H., Shu Y., 2015. Cadmium Transporters in the Kidney and Cadmium-Induced Nephrotoxicity. Int. J. Mol. Sci., 16:1484-1494.

Yildirim N. C., Benzer F., Danabas D., 2011. Evaluation of environmental pollution at Munzur river of Tunceli applying oxidative stress biomarkers in Cappotatrutta (Heckel, 1843). J. Anm. Plant Sci., 21(1): 66-71.

Zhai Q., Narbad A., Chen W., 2015. Dietary Strategies for the Treatment of Cadmium and Lead Toxicity.Nutrients 7: 552-571.

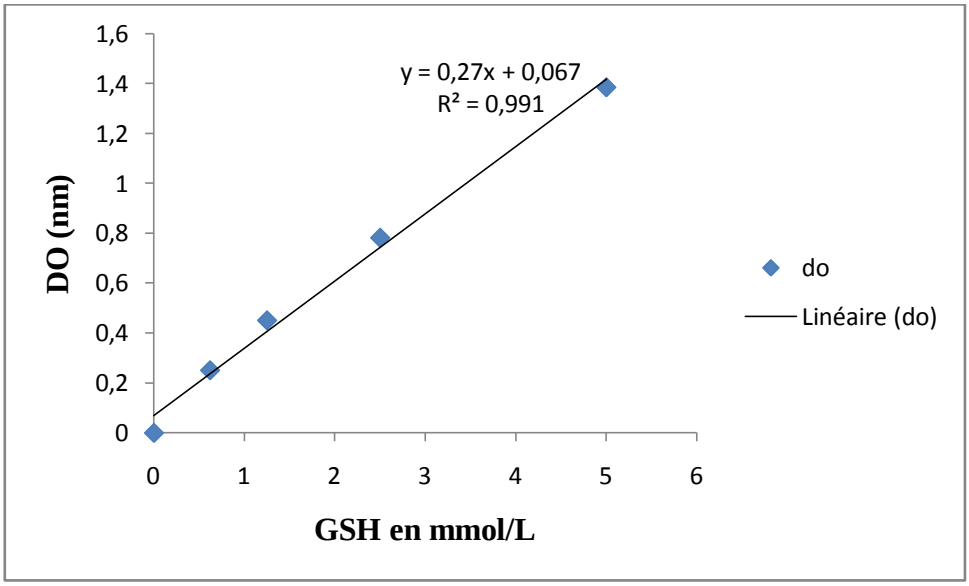
Zhu H., Zhang L., Amin A. R., Li Y., 2008. Coordinated upregulation of a series of endogenous antioxidants and phase 2 enzymes as a novel strategy for protecting renal tubular cells from oxidative and electrophilic stress. Exp. Biol Med (Maywood), 233(6):753-765.

Zhuo J. L., Li X. C., 2013. Proximal Nephron. Compr. Physiol., 3(3): 1079-1123.

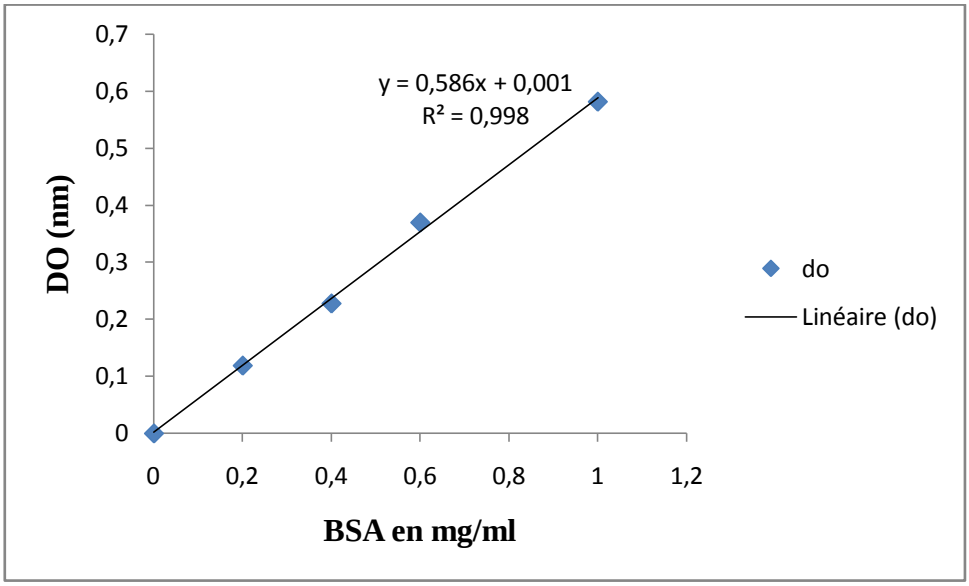
Annexes

Annexe

Annexe 01 : La courbe d'étalonnage de GSH.



Annexe 02 : La courbe d'étalonnage des protéines.



Thème:Evaluation des effets hépatiques et rénaux associés à l'exposition chronique des souris au plomb et au cadmium.

Encadré par : Dr. Kebièche M. **Présenté par: -Boucherim Karima - Bouharbit Sarra - Boulahmar Wissame**

Résumé

La toxicité des métaux lourds est l'un des problèmes environnementaux les plus redoutables et l'objet d'une grande préoccupation de la santé publique aujourd'hui. Le plomb et le cadmium sont des polluants dangereux pouvant perturber l'équilibre prooxydant/antioxydant et l'homéostasie antioxydant. L'objectif de notre travail est l'évaluation *in vivo* des risques hépatiques et rénaux liées à l'exposition chronique au Pb et au Cd. Cette étude est réalisée en appliquant un modèle de souris ayant été exposés à une faible dose de plomb et de cadmium 882 µg/kg et 48 µg/kg et leur mixture (882µg/kg + 48µg/kg) respectivement par voie orale pendant 6 mois. Les dosages des différents paramètres du stress oxydatif et des paramètres biochimiques sanguins (TGO, TGP, Urée et la créatinine) sont évalués par une méthode spectrophotométrique. Concernant les paramètres du stress oxydatif, une augmentation significative du taux de MDA, de l'activité de la CAT et de la GST cytosolique et une diminution significative du taux de GSH sont constatées. Par ailleurs les résultats de dosages biochimiques (TGO, TGP, créatinine et urée) enregistrent une augmentation significative. En fin, nous pouvons conclure que le Plomb et le Cadmium et leur mixture produisent un stress oxydatif conduisant à des effets hépatotoxiques et néphrotoxiques mis en évidence par une perturbation profonde des paramètres biochimiques sanguins, indicateurs de la modification de la fonction hépatique et rénale chez les souris.

Mots clé: Stress oxydatif, Plomb, Cadmium, foie, reins, souris.

Summary

The heavy metal toxicity is one of the most challenging environmental problems and the subject of great concern for public health today. Lead and cadmium are dangerous pollutants which can disrupt the pro-oxidant/antioxidant balance and antioxidant homeostasis. The aim of our work is the in vivo evaluation of liver and kidney risks of chronic exposure to lead and cadmium. This study, was performed using a mouse model having been exposed to low doses of lead and cadmium 882 µg/kg and 48 µg/kg and their mixture (882µg/kg+48µg/kg) respectively orally, for 6 months. Dosages of different parameters of the oxidative stress and biochemical parameters of blood GOT, GPT, urea and creatinine were measured by a spectrophotometric. About oxidative stress parameters, a significant increase in MDA levels, the activity of CAT and cytosolic GST and a significant decrease in GSH levels were found. In addition, biochemical analysis results (GOT, GPT, creatinine and urea) recorded a significant increase. Finally, we can conclude that lead and cadmium and their mixture produce oxidative stress leading to hepatotoxic and nephrotoxic effects highlighted by a profound disruption of the blood biochemical parameters indicators of change in liver and renal function in mouse.

Key words: Oxidative stress, Lead, Cadmium, liver; kidneys, mouse.

ملخص

المعادن الثقيلة هي موضوع دراسات عديدة , حيث يعتبر الرصاص والكادميوم من بين الملوثات الخطيرة التي تؤثر على صحة الإنسان إذ تؤدي إلي اختلال التوازن التأكسدي الخلوي. الهدف من هذه الدراسة هو التقييم الحيوي للمخاطر الكبدية و الكلوية المرتبطة بالتوضع المزمن للرصاص و الكادميوم . حيث أجريت الدراسة على الفئران المعرضة لهذه المعادن بجرعات ضعيفة عن طريق الفم 882 ميكروغرام/ كغ و 48 ميكروغرام/ كغ وخليط من العنصرين(882 ميكرو غرام/كغ + 48 ميكروغرام/ كغ لمدة 6 أشهر. النتائج أظهرت تغيرات ملموسة في مستوى المؤشرات البيوكيميائية TGO, TGP, ليوريا والكريتنين. فيما يخص مؤشرات الإجهاد التأكسدي نلاحظ زيادة في نسبة تأكسد الأحماض الدسمة بالإضافة إلى زيادة نشاط الإنزيمات المضادة للأكسدة . وفي الأخير ما يمكن استنتاجه من هذه الدراسة هو أن عنصر الرصاص و الكادميوم لهما تأثير سام على المؤشرات السالفة الذكر, مما أدى إلى ظهور أضرار على مستوى الأنسجة الكبدية و الوظيفة الكلوية.

الكلمات المفتاحية : الإجهاد الخلوي, الرصاص, الكادميوم, الكبد, الكلى , الفئران.