

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة محمد الصديق بن يحيى
كلية علوم الطبيعة والحياة
المكتبة
رقم الجرد : 1836



Université de Jijel

جامعة جيجل

Faculté des Sciences Exactes et Sciences de la Nature et de la Vie

كلية العلوم الدقيقة وعلوم الطبيعة والحياة

Département de Biologie Moléculaire et Cellulaire

قسم البيولوجيا الجزيئية و الخلية

Mémoire de Fin d'Etude Pour l'Obtention du Diplôme de Master
en Pharmacologie Expérimentale

Thème

*Effet de la Poudre de Liège Sur le Stress
Oxydatif Hépatique Induit Par le Plomb et le
Cadmium*

Réalisé par :

*SADOUDI Sihem
BOUCENNA Wissem
LEBSIR Dalila*

Soutenu le 1 Juillet 2012 devant le jury composé de:

Dr ALYANE Mohamed

Président

Pr LAHOUEL Mesbah

Rapporteur

Mr HENDIS Mohamed Essadek

Examineur

Remerciements

*Avant tout, nous remercions **DIEU** le tout puissant de nous avoir donné le courage et la volonté pour mener ce travail à terme.*

*Nous adressons nos sincères remerciements à notre promoteur **Pr. LAHOUEL Mesbah**, qui nous a aidé à réaliser ce modeste travail ; tout au long du quel nous a guider par ses conseils pertinents et judicieux ainsi que ses discussions fructueuses, qui nous a offert sa confiance ainsi que sa patience illimitée. Veuillez trouver ici le témoignage de notre profonde reconnaissance.*

*Nos remerciements s'adressent aux membres de jury : **Dr. ALYANE Mohamed** et **Mr. HENDIS Mohamed Essadek** pour l'honneur d'avoir accepté de juger ce travail, et d'apporter tous leurs soins dans l'évaluation de ce travail.*

Nous remercions également toute l'équipe du laboratoire de toxicologie et de laboratoire de biologie de l'université de Jijel.

Nous remercions tous ceux qui nous ont aidé et encouragés de près ou de loin durant la réalisation de ce travail. Et notamment :

***Dr. MAIZA Mohamed** ; responsable de laboratoire d'analyses à l'hôpital de Jijel, pour nous avoir bien accueilli dans son laboratoire.*

***Dr. CHELGHAM Kheldoune**; responsable de laboratoire d'hygiène de Jijel, qui nous a accueillis dans son laboratoire et qui nous a aidés à réaliser notre étude histologique.*

Enfin nous tenons à exprimer notre gratitude et nos remerciements pour l'ensemble des enseignants ayant participé à notre formation.

Sincères remerciements

À la mémoire du frère de notre collègue LEBSIR Mohamed Tayeb

À nos pères et mères pour leur soutien indéfectible

À nos frères et sœurs

À nos familles

À tous nos amis et connaissances

Liste des abréviations

| | |
|-----------------------------------|---------------------------------------|
| CAT | Catalase |
| Cd | Cadmium |
| Cd Cl₂ | Chlorure de cadmium |
| Cr | Chrome |
| Cu | Cuivre |
| DTNB | Acide 5-5-dithiobis 2-nitrobenzoïque |
| EDTA | Acide éthylène diamine tétra-acétique |
| GPx | Glutathion peroxydases |
| GSH | Glutathion réduit |
| Hg | Mercure |
| H₂O₂ | Peroxyde d'hydrogène |
| KCL | Chlorure de potassium |
| Mn | Manganèse |
| MDA | Malondialdehyde |
| MTs | Métalloprotéines |
| NBT | Nitroblue- tetrazolium |
| Ni | Nickel |
| O[°]₂ | Anion superoxyde |
| OH[°] | Radical Hydroxyle |
| PAL | Phosphatase alcaline |
| Pb | Plomb |
| Pb NO₃ | Nitrate de plomb |
| ROS | Reactive oxygen species |
| Sb | Antimoine |
| SOD | Super oxide dismutase |
| TBA | Acide thiobarbiturique |
| TCA | Acide trichloracétique |

| | |
|------------|------------------------------------|
| TGO | Glutamate Oxaloacetate Transferase |
| TGP | Glutamate Pyruvate Transférase |
| TNB | Acide thionitrobenzoïque |
| Zn | Zinc |

Sommaire

| | |
|---|----|
| Introduction | 1 |
| I. Analyse bibliographique | 3 |
| I.1. Implication des métaux lourds dans la génération du stress oxydant | 4 |
| I.2. Le plomb | 4 |
| I.2.1.La toxicocinétique du plomb..... | 5 |
| I.2.2.La toxicité du plomb..... | 6 |
| I.2.3.Effets sur les oxydations cellulaires..... | 7 |
| I.3. Le cadmium | 8 |
| I.3.1.La toxicocinétique du cadmium..... | 8 |
| I.3.2.La toxicité du cadmium..... | 9 |
| I.3.3.Effets sur les oxydations cellulaires..... | 10 |
| I.4. La poudre de liège | 11 |
| I.5. La composition chimique de la poudre de liège | 12 |
| I.5.1. La subérine..... | 13 |
| I.5.2. La lignine..... | 14 |
| I.5.3. Les polysaccharides..... | 15 |
| I.6. Les propriétés adsorbantes de la poudre de liège | 16 |
| I.6.1. L'adsorption des métaux lourds par la biomasse de liège..... | 16 |
| I.6.2. L'étude de l'adsorption du cadmium dans un milieu synthétique par la biomasse de liège : Équilibre, études dynamiques et thermodynamiques..... | 17 |
| I.7. La pharmacocinétique de la poudre de liège | 17 |
| I.8. Les effets pharmacologiques de la poudre de liège | 18 |
| II. Matériel et méthodes | 19 |

| | |
|---|----|
| Matériel | 20 |
| II.1. Partie galénique | 20 |
| II.1.1. Tamisage de la poudre de liège..... | 20 |
| II.1.2. Lavage et séchage de la poudre de liège..... | 20 |
| II.2. Partie biologique | 20 |
| II.2.1. Entretien des animaux..... | 21 |
| II.2.2. Sacrifice des animaux et prélèvements des échantillons biologiques..... | 21 |
| Méthodes | 22 |
| II.3. Dosages biochimiques | 22 |
| II.3.1. Dosage de la créatinine sérique..... | 22 |
| II.3.2. Dosage des transaminases..... | 22 |
| II.3.3. Dosages des phosphatases alcalines..... | 23 |
| II.4. Dosages tissulaires | 23 |
| II.4.1. Dosage du malondialdéhyde (MDA) cytosolique | 23 |
| II.4.2. Dosage du glutathion réduit hépatique..... | 24 |
| II.4.3. Préparation de la fraction cytosolique..... | 25 |
| II.4.3.1. Dosage de l'activité de la catalase cytosolique..... | 25 |
| II.4.3.2. Dosage de l'activité de la SOD cytosolique..... | 26 |
| II.5. Mesure de la respiration mitochondriale du foie | 27 |
| II.5.1. Isolement des mitochondries..... | 27 |
| II.5.2. Mesure de la respiration mitochondriale..... | 28 |
| II.6. Etude histologique | 28 |
| II.7. Etude statistique | 29 |
| | |
| III. Résultats et Discussion | 30 |
| Résultats | 31 |
| | |
| III.1. Résultats des analyses biochimiques | 31 |
| III.1.1. Evaluation des taux de TGP plasmatique..... | 31 |

| | |
|--|-----------|
| III.1.2. Evaluation des taux de TGO plasmatique..... | 32 |
| III.1.3. Evaluation des taux des PAL plasmatique..... | 32 |
| III.1.4. Evaluation de la tolérance de la poudre de liège..... | 33 |
| III.2. Résultats du dosage tissulaire..... | 35 |
| III.2.1. Evaluation de la peroxydation lipidique cytosolique hépatique..... | 35 |
| III.2.2. Evaluation de taux de glutathion cytosolique hépatique..... | 36 |
| III.2.3. Evaluation de l'activité enzymatique de la SOD cytosolique hépatique..... | 37 |
| III.2.4. Evaluation de l'activité enzymatique de la catalase cytosolique hépatique.... | 38 |
| III.3. Résultats de la respiration mitochondriale du foie..... | 39 |
| III.4. Résultats de l'étude histologique..... | 41 |
| | |
| Discussion..... | 44 |
| | |
| Conclusion..... | 47 |
| | |
| Références bibliographiques..... | 49 |

Introduction

Le plomb et le cadmium sont parmi les polluants les plus largement distribués dans l'environnement. À cause de leur forte persistance, ils font partie des toxiques les plus puissants et les plus dangereux aussi bien pour l'environnement que pour l'homme.

Ces toxiques pénètrent dans l'organisme par la respiration, l'absorption cutanée, l'alimentation (légumes, eau, abats d'animaux contaminés...) ou aussi par l'exposition quotidienne aux innombrables produits chimiques créés et employés par les humains. Ces métaux lourds exercent leurs actions délétères par une forte production d'espèces réactives de l'oxygène qui à leur tour induisent un stress oxydant (Brunet, 1999).

Comme le foie intervient de manière active dans le métabolisme de nombreuses molécules et dans l'homéostasie, il se trouve exposé aux lésions oxydatives dès le premier passage de substances dangereuses comme les métaux lourds, ou après transformation métabolique de substances non toxiques en métabolites toxiques (Berthoin, 2000). En effet, certaines études ont fait remarquer l'implication des métaux lourds dans la genèse des ROS responsables de dommages oxydatifs (Stohs et Baghi ; 1995 ; Toppi et Gabrieli, 1999). Ces changements pourraient présenter un grand risque pour la reproduction et la survie des organismes exposés (Eatih Fidan, 2008). Par conséquent, une attention particulière doit être accordée aux moyens thérapeutiques à développer en clinique humaine pour lutter contre une intoxication métallique (détoxication).

Dans le but d'une recherche de remédiations à une situation pareille d'intoxication clinique potentielle par les métaux lourds nous avons entamé une étude en ayant recours à la poudre de liège. Le liège étant un matériau naturel biodégradable dont l'industrie génère de grandes quantités de déchets sous forme de poudre peut être utilisé dans l'élimination des métaux lourds grâce à sa capacité de complexation. Notre étude consiste à évaluer la tolérance de la poudre, et l'évaluation de son effet sur le stress oxydatif au niveau des organes cible en particulier le foie.

I. Analyse bibliographique

I.1 Implication des métaux lourds dans la génération du stress oxydant

Si les métaux sont souvent indispensables au déroulement des processus biologiques (oligoéléments), nombre d'entre eux peuvent s'avérer toxiques, lorsque leur concentration dépasse un seuil, c'est le cas du Fe, Cu, Zn, Ni, Se, Mo et Mn. D'autres ne sont pas nécessaires à la vie et peuvent être même néfastes comme As, Cd, Cr, Hg, Pb et Sb, (Miquel, 2001).

Une hypothèse de plus en plus grandissante indique que les métaux lourds (Fe, Cu, Zn, Cd, Pb, Ag, Hg, Ni) jouent le rôle de catalyseur dans la détérioration oxydative des macromolécules biologiques et des tissus. De nombreuses études récentes montrent leur capacité à catalyser des radicaux libres entraînant la peroxydation des lipides, la réduction des groupements sulfhydriques des protéines, l'altération de l'homéostasie de calcium et finalement les dommages de l'ADN (Valko *et al.*, 2006).

Le rôle des métaux lourds dans la formation des ROS est lié à leur capacité à exister sous différents états d'oxydation. En effet, les cations d'éléments comme Fe, Cu, Cr ou Mn sont capables de céder un ou plusieurs électrons susceptibles de réduire l'oxygène et ses dérivés. Les plus connues de ces réactions sont la réaction de Fenton et celle d'Haber –weiss. Par ailleurs, même des métaux qui n'existent que sous un seul état d'oxydation, tels que Cd et Pb par exemple, peuvent induire une accumulation de ROS pour trois raisons : une perturbation de certaines voies métaboliques, une inactivation et un «down régulation» des enzymes du système antioxydant ou un épuisement du stock de molécules antioxydantes comme l'ascorbate, le glutathion, la vitamine E ou les caroténoïdes (Toppi, 1999).

I.2. Le plomb

Le plomb est un métal largement utilisé depuis la période antique. Il vient du latin plumbum signifiant liquide argenté. C'est un métal bleu grisâtre, malléable et ductile dont le point de fusion est de 327C° et le point d'ébullition de 1525 C° (Plante *et al.*, 1998). Extrait de minerais pour la production d'ustensiles, de récipients, de conduites, de soudure et de monnaies, le plomb a connu son apogée à l'époque romaine (d'après des écrits de Galien, Avicenne ou Pline). Avant de reprendre son envol avec la révolution industrielle où une demande sans précédent s'est accompagné d'une augmentation exponentielle de l'intensité des émissions dans l'atmosphère. Ainsi, le plomb est un polluant qui s'accumule au cours du temps. Très peu mobile, le plomb déposé sur les sols demeure dans les couches superficielles où il reste accessible au contact de

l'homme. Cette exposition conduit à une symptomatologie de l'intoxication par le plomb souvent moins parlante que celle de l'exposition massive professionnelle.

Le plomb, même à faible dose, demeure toutefois responsable d'effets graves sur la santé, en particulier chez la population " à risque " des enfants de moins de 6 ans. Il peut causer des troubles neurologiques, hématologiques, gastro-intestinales, reproductives, immunologiques et apoptotiques (Patrick, 2006 ; Xu *et al.*, 2008). Le seuil de qualité sanitaire réglementaire est de 1,5 mg/kg dans l'alimentation selon le règlement européen CE 221/2002.

I.2.1. La toxicocinétique du plomb

Le plomb pénètre essentiellement dans l'organisme par voie digestive et pulmonaire. La voie pulmonaire est surtout importante pour les personnes exposées en milieu professionnel, qui inhalent le plomb sous forme particulaire. En population générale, le plomb peut être ingéré avec les aliments contaminés et l'eau de boisson émanant de canalisations contenant du plomb. (CIREI, 2001).

Le taux d'absorption chez l'adulte est de l'ordre de 5 à 10%, alors qu'il est environ de 50% chez l'enfant (Laperche *et al.*, 2004). Les régimes carencés en fer, calcium, phosphore, zinc, vitamine B₁, manganèse ou fibres végétales l'augmentent (Miquel, 2001).

Le plomb absorbé passe dans la circulation sanguine ou plus de 90% est fixé aux érythrocytes au niveau de la membrane et de l'hémoglobine ; le reste diffuse dans le sérum ; il est ensuite distribué à divers organes et tissus.

Selon Amadur *et al.*, 1996, les études cinétiques chez l'animal et l'homme indiquent principalement trois compartiments :

- **La masse sanguine et quelques tissus à échange rapides** ; la demi vie du plomb y'est d'environ 1 mois ; la concentration sanguine est modulée par des variations individuelles d'origine nutritionnelles (interférence avec le zinc et le cuivre).
- **Le système nerveux central et périphérique ainsi que le foie ; les reins ; les muscles** ; la demi vie du plomb y est d'environ 40 à 60 jours. Dans le SNC le plomb se concentre dans la substance grise et certains noyaux ; les plus forte concentrations se retrouvent dans l'hippocampe suivi par le cervelet ; le cortex cérébrale et la moelle. Dans les reins il se retrouve dans le cortex.
- **Le squelette** ; le compartiment le plus chargé et pour lequel la cinétique de renouvellement est la plus lente ; il contient environ 90% du plomb total et la demi vie est d'environ 20 à 30 ans

chez l'homme (CIREI, 2001) ; et 60 à 100 jours chez le rat. Le taux du plomb dans ce compartiment augmente avec le temps par transfère à partir des deux autres.

Le plomb s'accumule dans les poumons, il traverse la barrière placentaire et peut s'accumulé dans les tissus fœtaux (sang ; foie ; cerveaux et squelette).La distribution corporelle du plomb est influencé par l'âge et la nutrition (Kasprzak *et al.*, 1985).

Le plomb absorbé est principalement éliminé par voie urinaire (environ 80%) ; le reste est éliminé par la bile (environ 16%) ; les sécrétions gastro intestinal ; la sueur et les phanères (environ 8%). L'excrétion rénale se fait par filtration glomérulaire, avec une réabsorption tubulaire possible. Chez l'animal la clairance biliaire varie avec l'espèce : 0.16 à 8% du plomb absorbé chez le chien, le lapin et le rat. Chez l'homme comme la concentration du plomb dans la bile est 10 fois supérieure à celle de l'urine il est probable que le plomb excrété par voie biliaire soit en grande partie réabsorbé par la muqueuse intestinale pour être finalement excrété par voie urinaire. Le plomb en raison de sa similarité avec le calcium est excrété dans le lait (IARC ,1980).

I.2.2. La toxicité du plomb

a) Toxicité aiguë

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

- **Chez l'enfant** : l'intoxication aiguë au plomb est caractérisée par l'anorexie, les vomissements, l'irritabilité et les troubles de comportements (Laperche *et al.*, 2004),
- **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 atteint 30 à 50ug/dl (1,44 à 2,4mol/l) (Casas, 2005).

Par ailleurs, une intoxication sévère peut provoquer des convulsions, le coma et parfois même la mort et ce, tant chez l'enfant que chez l'adulte. L'intoxication aiguë au plomb est très rare dans les pays développés, mais elle s'observe encore chez les travailleurs exposés à des fortes concentrations de plomb (Casas, 2005).

b) Toxicité chronique- le saturnisme

Le saturnisme est une maladie résultante d'une intoxication chronique, professionnelle ou domestique par le plomb. La population infantile est la plus exposée du fait du coefficient d'absorption du plomb plus élevé chez l'enfant que chez l'adulte (Laperche, 2004).

Selon Décloître (1998), le sujet atteint peut être confronté à de nombreux effets toxiques :

- **Troubles neurologiques (effets critiques)** : chez l'enfant à partir de 100 à 300ug/l de plomb sanguin : troubles comportementaux, stagnation ou régression du développement intellectuel ; chez l'adulte à partir de 400 à 700ug/l de plomb sanguin : fatigue, maladresse, irritabilité, troubles mnésiques. Atteintes de système nerveux périphérique.
- **Troubles rénaux** : Le plomb peut produire deux types d'atteinte rénale :
 - 1- Une tubulopathie proximale : correspondant à une plombémie dépassant généralement 700µg/L ; elle se traduit par une fuite de protéines de faibles poids moléculaires; chez l'enfant.
 - 2- Une atteinte rénale tardive : qui s'observe après 10 à 30 ans d'exposition, à des niveaux d'imprégnation correspondant à une plombémie supérieure à 600µg/L ; c'est une insuffisance rénale modérée due à des lésions glomérulaires et tubulo-interstitielles sans caractère spécifique ; elle est définitive.
- **Troubles hématologiques** : inhibition de l'activité enzymatique de la synthèse de l'hème
Troubles cardiovasculaires : l'effet sur l'hypertension artérielle est suggéré mais non démontré.
- **Cancérogénicité** : Sa cancérogénicité a été démontrée chez l'animale mais insuffisamment démontré chez l'homme.

I.2.3. Effets sur les oxydations cellulaires

L'activité pro-oxydante du plomb a été étudiée et démontrée dans de nombreuses études. Le plomb joue in vitro un rôle de catalyseur des réactions de peroxydation lipidique (Christie et Costa, 1984; Yiin et Lin, 1995; Shafiqur *et al.*, 1995; Sandhir et Gill, 1995; Gurer *et al.*, 1998), potentiellement responsable de la toxicité du plomb sur différents organes.

Ainsi, Dominguez *et al.*, (1995) ont pu mettre en évidence sur les fibroblastes humains l'effet cytotoxique du plomb à des concentrations très élevées: la durée de vie des cellules exposées était diminuée et la peroxydation des lipides augmentée.

L'exposition prolongée au plomb s'accompagne d'une augmentation de la production des dérivés actifs de l'oxygène (Vaziri *et al.*, 1997) et d'une diminution en glutathion et en groupements sulfhydriles (Skoczynska, 1997). Parallèlement, une baisse de l'excrétion urinaire

d'oxyde nitrique est observée dans un modèle d'hypertension induite par le plomb chez le rat (Vaziri *et al.*, 1997; Ding *et al.*, 1998). Cette production accrue de dérivés oxydants a également été démontrée *in vivo* dans le sperme de rat (Hsu *et al.*, 1997), corrélée à une perturbation fonctionnelle des spermatozoïdes.

Bondy et Guo (1996) ont montré que le plomb potentialisait *in vitro* la formation de DAO induite par le fer, suggérant ainsi que le niveau de fer *in vivo* pourrait être un facteur intervenant dans la sévérité de l'intoxication par le plomb. Parallèlement à l'augmentation de la peroxydation des lipides, l'activité de la plupart des enzymes anti-oxydantes (superoxyde dismutase, catalase, glutathion peroxydase et glutathion réductase) est expérimentalement inhibée par l'exposition au plomb (Sandhir et Gill, 1995).

I.3. Le cadmium

Le cadmium est un métal blanc argenté, brillant, malléable et ductile. Il ne participe à aucun processus vital et il est toxique à de très faibles concentrations ; vient du latin *cadmia*, «calamine», ancien nom donné au carbonate de zinc. Il est classifié comme un carcinogène de type I par l'agence internationale pour la recherche sur le cancer et le programme national de toxicologie USA (IARC 1993; nasim US NTP 2000; Who, 1992).

On le retrouve comme contaminant dans les sédiments, l'air, l'eau (Waisberg *et al.*, 2003), dans l'agriculture et les rejets industriels, la fumée de cigarette (Fassett, 1975; He *et al.*, 2005; Jarup, 2003; Trinchella *et al.*, 2006). Le traitement des ordures ménagères reste le premier secteur responsable d'émissions de Cd.

I.3.1. La toxicocinétique du cadmium

L'absorption digestive des composés de cadmium est faible, de l'ordre de 3 à 7%, l'absorption pulmonaire dépend de la granulométrie et de la solubilité du composé. (Pichard, 2005).

Après absorption, ce métal est transporté par le sang, fixé à 70% aux érythrocytes sous forme lié à l'hémoglobine et son taux y est normalement très faible (inférieur à 10µg/l chez les sujet non exposés), en cas d'exposition prolongé ce taux sanguin monte lentement et régulièrement jusqu'à un plateau : il baisse en fin d'exposition, avec une demi vie estimé à 40-80 jours. Il se concentre ensuite à 75% dans le foie et les reins, par liaisons avec la métallothéionéine tissulaire participant ainsi à l'accumulation de ce métal au sein de ces organes (Pillet, 2001). Le complexe

cadmium- métallothéionéine est lentement libéré dans le sang, puis réabsorbé par les reins (Tierra, 2002).

L'excrétion, faible et très lente, spécifique essentiellement par voie urinaire et très faiblement par voie fécale (< 1 %) et par la sueur et la salive. Le cadmium est un toxique cumulatif : sa $\frac{1}{2}$ vie biologique est estimée chez les souris et les rats entre 200 et 700 jours, chez certains primates, elle peut même dépasser 40 ans (Pilliere, 2002).

I.3.2. La toxicité du cadmium

a) Toxicité aiguë

L'ingestion de dérivés inorganiques du cadmium provoque chez l'homme des troubles digestifs intenses, caractérisés par des douleurs abdominales, des diarrhées, des nausées et des vomissements. Les pertes digestives sont responsables d'une hypo volémie et de désordres hydro électrolytiques (Pillet, 2001). Certains cas d'intoxications aiguës ont été observés à la suite de l'ingestion d'aliments ayant été en contact avec des récipients colorés par des pigments à base de cadmium (Joris, 2005).

L'insuffisance rénale est la conséquence des troubles hémodynamiques et d'un effet toxique direct sur les tubules rénaux. En cas d'intoxication massive, on observe une acidose métabolique intense et une coagulation de consommation entraînant la mort en quelques heures (Pillet, 2001).

b) Toxicité chronique

Les principaux effets à long terme d'une exposition à des niveaux élevés de cadmium sont les maladies rénales, les maladies obstructives respiratoires (limitées à l'exposition professionnelle) et les maladies des os.

Le syndrome appelé itai- itai a été observée pour la première fois au Japon. Il a été dû 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 ostéoporose et ostéomalacie. (Joris, 2005).

Les effets cancérigènes du cadmium ont été démontrés au cours d'études sur les animaux. Des études épidémiologiques menées sur des travailleurs exposés professionnellement laissent croire à la possibilité d'une association entre l'inhalation de cadmium et le cancer du poumon et la prostate (Pilliere, 2002).

I.3.3. Effets sur les oxydations cellulaires

Le Cd est un inducteur de stress oxydatif dont le mécanisme exact d'induction d'espèces réactives d'oxygène n'est toujours pas connu. Cependant, il a été démontré qu'il se produit une accumulation de H₂O₂ lors d'une exposition cellulaire au Cd (Schützendübel *et al.*, 2001).

En fait, les mécanismes d'action du Cd semblent être multiples, Les trois principales hypothèses émises sont :

1-La libération du Fe de ses sites de liaison causée par le Cd, le Fe étant un métal de Fenton qui peut amener la production d'OH° en présence de H₂O₂. (Watanabe *et al.*, 2003)

2-La liaison du Cd aux groupements sulfhydryls de certaines molécules comme le GSH.

3-L'inhibition de la chaîne de transport d'électrons amenant une accumulation de semiubiquinones formant des O₂°(Casalino *et al.*, 1997; Souza *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2004).

Le Cd ne fait pas qu'induire un stress oxydatif, il réduit aussi les défenses antioxydantes de la cellule. (Joris, 2005).

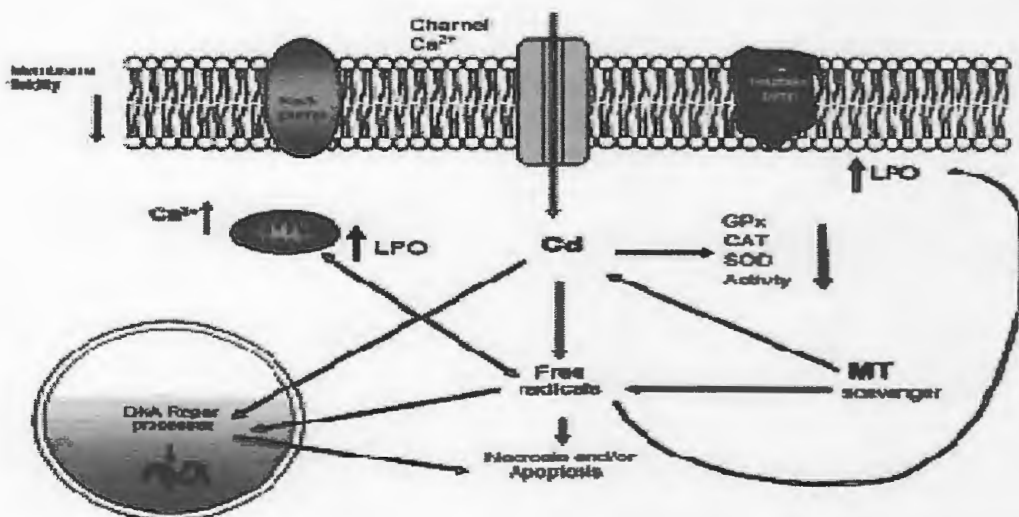


Figure 1 : Mécanisme d'un stress oxydatif induit par le Cd dans une cellule nerveuse (Armenta *et al.*, 2007).

Un autre mécanisme possible a été présenté il y a quelques années, est l'augmentation de la concentration en fer ou en cuivre à la suite de leur déplacement par le cadmium de métalloprotéines (MTs).

Les MTs, protéines riches en groupements SH, sont synthétisées principalement par le foie et le rein. Elles jouent un rôle important dans l'homéostasie des métaux essentiels et dans la

protection contre les effets toxiques des métaux lourds en séquestrant la fraction ionique libre (Messaoudi *et al*, 2002).

Selon ce mécanisme, le cadmium peut déplacer le fer et le cuivre de diverses protéines cytoplasmiques et membranaires (ferretine, apo- ferretine). A l'inverse du cadmium, ces deux métaux peuvent causer un stress oxydant direct par réaction de Fenton (Joris, 2005). Les résultats rapportés par une étude récente réalisée par Watjen *et al.*, 2004 représentent une confirmation de cette hypothèse. Le Cd provoque des altérations profondes du métabolisme du Ca^{++} , qui consistent, à une résorption osseuse (Ando *et al*, 1978), une calciurie (Kim *et al*, 1988) et une basse de la calcémie (Messaoudi *et al*, 2002). Une déficience en zinc augmente aussi la fixation du Cd par le foie et le rein et intensifiée la toxicité de ce métal.

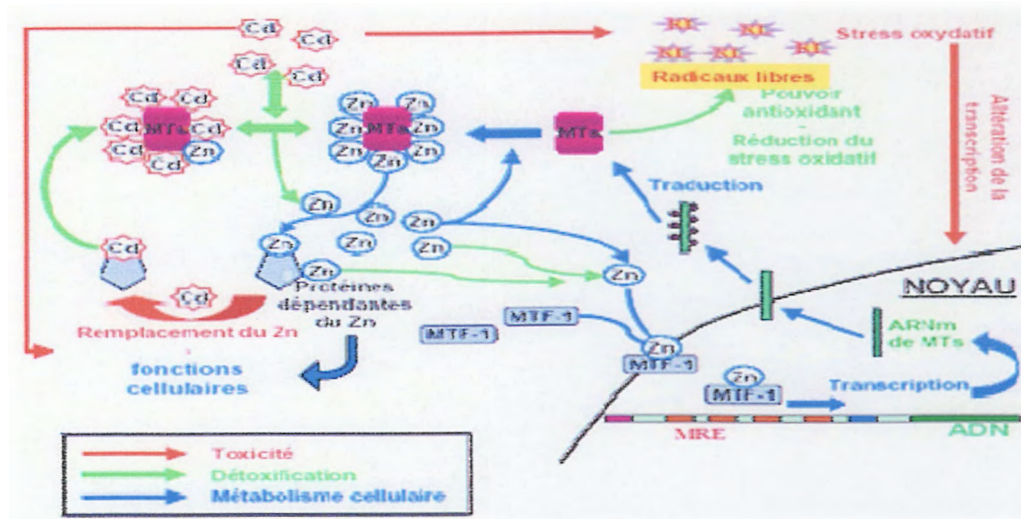


Figure 2 : Interaction entre le cadmium et le zinc liés aux metallothioneines (Pillet, 2001).

1.4. La poudre de liège

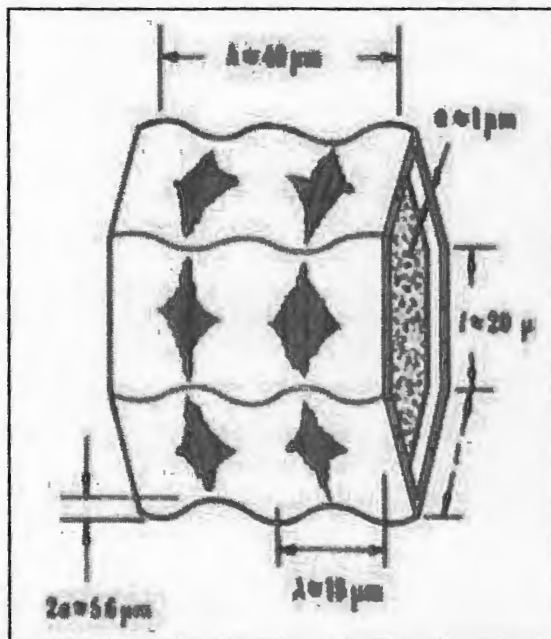
La poudre de liège est le résultat de la transformation industrielle du liège, qui est l'écorce du chêne liège, de l'espèce *Quercus suber* L, appartenant à l'embranchement des Angiospermes, la famille des Fagacées (Nativadade, 1956).

Le chêne liège est une essence très répandue dans les régions tempérées et méditerranéennes de l'Algérie surtout dans la wilaya de Jijel. Il forme de véritables subéraies qui jouent un rôle indéniable sur le plan écologique, économique et social du pays.

La poudre de liège est un matériau de couleur marron foncé et de granulométrie très fine, pouvant être utilisé dans l'élimination des métaux lourds grâce à sa capacité de complexation.

Elle est constituée de cellules alvéolaires analogues à celles d'un nid d'abeilles, aux parois fines, disposées de façon régulière sans espaces intercellulaire. Les cellules ont une forme principalement hexagonale. Certaines peuvent avoir cinq, sept ou huit côtés (Gibson *et al.*, 1981).

Des scientifiques ont également déterminé les dimensions d'une cellule et ont observé que chaque cellule possède deux ou trois ondulations complètes (Figure 3).



- Epaisseur de la paroi e (μm) : $1 \pm 0,5$
- Hauteur de la cellule h (μm) : 43 ± 4
- Longueur d'un côté de la face Hexagonale l (μm) : 21 ± 4
- Nombre de cellules N/mm^3 : 2×10^4
- Longueur de l'ondulation λ (μm) : $15 \pm 2,3$
- Amplitude de l'ondulation a (μm) : $2,8 \pm 1$

Figure 3: Ondulation d'une cellule et ses dimensions (Gibson *et al.*, 1981).

I.5. La composition chimique de la poudre de liège

Un grand nombre de facteurs vont influencer la composition chimique du liège tels que : les origines géographique et génétique de l'arbre, ses dimensions, son âge, le climat, le sol et les conditions de croissance (Pereira, 1988). Donc la composition chimique va être différente d'un arbre à un autre.

Il existe trois types de liège : « le liège vierge » ou le liège mâle qui est issu de la première récolte, il a une structure très irrégulière, « le liège de reproduction » obtenu neuf ans après le levé du liège mâle, et enfin « le liège Amadia » ou le liège femelle qui est obtenu à partir de la troisième récolte et qui est d'excellente qualité (Fialho *et al.*, 2001).

Le liège est majoritairement constitué de subérine, lignine et polysaccharides. Une grande variabilité de la teneur de ces constituants est observée selon le type de liège (Tableau 1).

Tableau 1 : pourcentage massique des différents constituants de la cellule du liège vierge et du liège « Amadia » (deuxième reproduction).

| Constituants | Liège vierge | Amadia | Références |
|--|--------------|--------|------------|
| Subérine % | 45 | 33-50 | 1-5 |
| Lignine % | 21-27 | 13-29 | 1-5 |
| Polysaccharides (cellulose et hémicellulose) % | 12-13 | 6-25 | 1-3 ; 6-8 |
| Cires % | - | 2-7.9 | 2, 6, 8 |
| Tannins % | - | 1-7 | 6, 8 |

Références du tableau:

1 = (Caldas *et al.*, 1985)*, 2 = (Pereira, 1988), 3 = (Parameswaran *et al.*, 1981)*, 4 = (Carvalho, 1968)*, 5 = (Gil *et al.*, 2002)*, 6 = Natividade, 1990)*, 8= d'après (Silva *et al.*, 2005)*.

Les cellules de la poudre de liège sont constituées par trois couches de différents polymères agencés de façon précise (Figure 4) : la paroi interne primaire est fine et riche en lignine qui joue un rôle de « ciment », la paroi secondaire plus épaisse est formée par l'alternance de lamelles de subérine et de cire et enfin la paroi tertiaire, fine, est constituée de polysaccharides. Cette structure a été proposée pour la première fois en 1878 par Von Hohnel (Pereira 2007b).

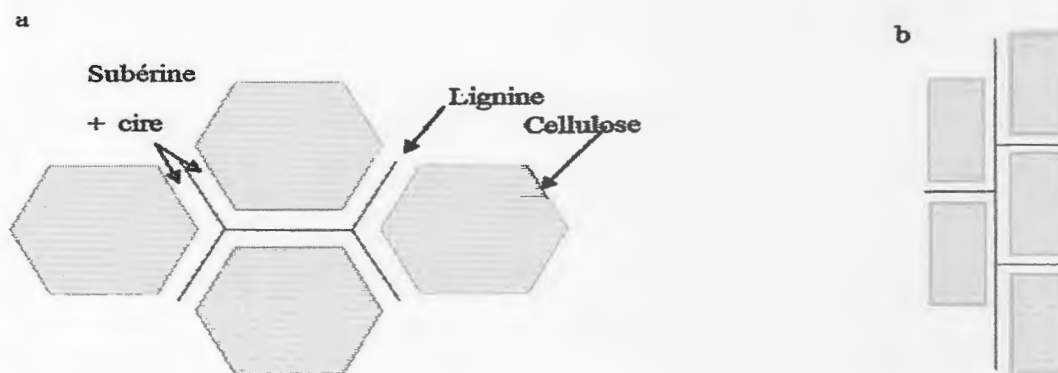


Figure 4: Représentation schématique des cellules du liège avec l'agencement de ses constituants chimiques. a) section radiale, b) sections axiale ou tangentielle (Pereira 2007b).

I.5.1. La subérine

La subérine est le principal constituant du liège. Il représente environ 50 % du matériau. C'est un composé très stable chimiquement et sa principale fonction est son rôle de barrière à l'eau (Gil *et al.*, 2000), aux solutés et aux agents microbiens (Bernards, 2002; Vane *et al.*, 2006).

Pour ce qui concerne la subérine du liège il a fallu attendre ces dix dernières années (Cordeiro *et al.*, 1998a; Lopes *et al.*, 2000a; Lopes *et al.*, 2000b; Rocha *et al.*, 2001; Bernards, 2002;

Santos *et al.*, 2006) pour obtenir de meilleures connaissances. Cependant il existe toujours une controverse sur la délimitation chimique du terme subérine.

L'étude de Perra *et al.*, 1995, sur la subérine de l'écorce de hêtre montre que la subérine serait majoritairement un polymère aliphatique avec de longues chaînes d'acides gras saturés et insaturés avec des liaisons esters et la présence de quelques acides et alcools phénoliques.

La structure de la subérine n'est donc pas encore clairement définie, un seul modèle de structure ayant été proposé pour la subérine du liège (Figure 5).

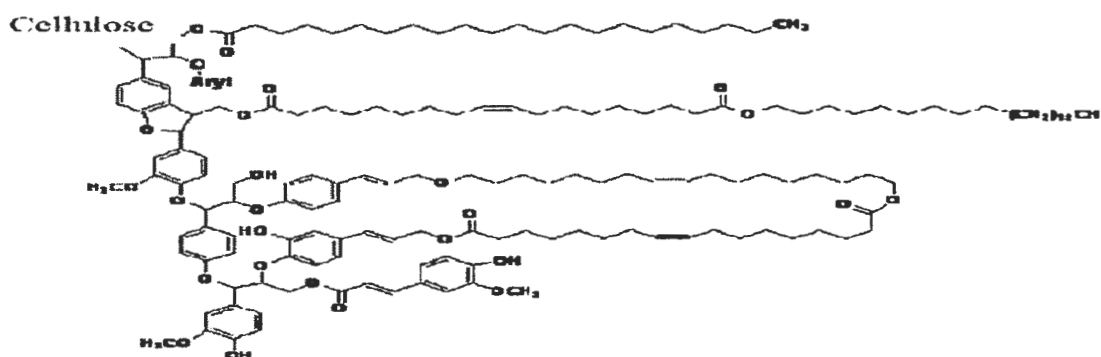


Figure 5 : Structure proposée pour la subérine du liège (Silva *et al.*, 2005).

Les monomères constituant la subérine sont nombreux et répertoriés dans différentes classes chimiques : glycérol, acides et alcools gras (Bento *et al.*, 1998 ; Graça *et al.*, 2000a ; Graça *et al.*, 2006b). Ces monomères sont associés par des liaisons esters (Graça *et al.*, 2006) entre les groupements carboxyliques et hydroxyles. La base du développement macromoléculaire de la subérine est un lien entre les acides gras et le glycérol (Graça *et al.*, 1997; Moire *et al.*, 1999; Santos *et al.*, 2006).

I.5.2. La lignine

Le second constituant structural du liège est la lignine, environ 20 à 25 %. Même si la chimie de la lignine est étudiée depuis longtemps par l'intermédiaire de la recherche sur le bois (Kudzin *et al.*, 1951; Schubert *et al.*, 1953), la caractérisation de la lignine provenant du liège est beaucoup plus récente (Marques *et al.*, 1994). Dans le liège, son rôle est d'offrir un support mécanique et une rigidité aux parois cellulaires. Comme pour la subérine sa structure n'est pas encore complètement établie.

C'est une macromolécule polyaromatique complexe (Figure 6) formée par la polymérisation de trois monomères phénylpropanes liés par des liaisons covalentes (C-O et C-C), possédant des groupements fonctionnels différents : des groupements hydroxyles aromatiques et aliphatiques, des groupements méthoxyles et des composés chimiques tels que l'alcool benzylique et les éthers.

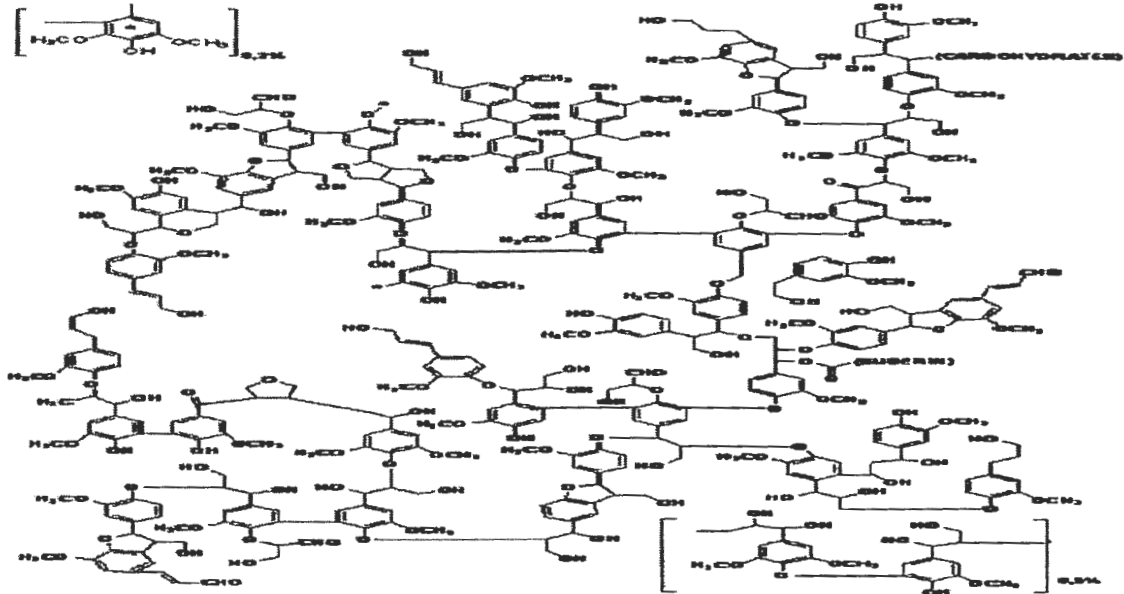


Figure 6 : Structure de la lignine du liège d'après Gil (Silva *et al.*, 2005).

I.5.3. Les polysaccharides

Les polysaccharides (cellulose et hémicellulose) représentent environ 20 % de la composition chimique du liège.

La cellulose ne joue pas un rôle déterminant dans les propriétés physicochimiques du liège et très peu de données existent (Asensio, 1987b).

Concernant les hémicelluloses du liège, leur étude a permis d'en identifier trois différentes à base de xylans (Asensio, 1987a, 1988) : la 4-*O*-méthylglucuronoxylan, l'arabino-4-*O*-méthylglucuronoxylan et la 4-*O*-méthylglucurono-arabinogalactoglucoxylan.

Aux côtés de ses constituants majoritaires, Conde *et al.* (1999) ont caractérisé les extractibles contenus dans le liège ; n-alcanes, n alcools, cires, triterpènes, acides gras, glycérides, stérols, phénols et polyphénols. Elles sont réparties en deux catégories : les molécules aliphatiques (5 à 8 % de la poudre) solubles dans les solvants peu polaires, les molécules phénoliques et polyphénoliques (Conde *et al.*, 1997;1998; Pena-Neira *et al.*, 1999) (6 à 9 % de la poudre)

solubles dans les solvants polaires, les plus importantes étant les flavonoïdes et les tannins hydrolysables.

I.6. Les propriétés adsorbantes de la poudre de liège

L'adsorption est un phénomène de surface par lequel des molécules de gaz ou de liquides se fixent sur les surfaces solides des adsorbants selon divers processus plus ou moins intenses. On distingue souvent la chimisorption et la physisorption. Le phénomène inverse par lequel les molécules se détachent est la désorption. De plus, l'adsorption est un phénomène spontané et se produit dès qu'une surface solide est mise en contact avec un gaz ou une autre molécule. On appelle généralement « adsorbat » la molécule qui s'adsorbe et « adsorbant » le solide sur lequel s'adsorbe la molécule.

Le phénomène de l'adsorption provient de l'existence à la surface du solide, des forces non compensées (force d'attraction déséquilibrées). Ces forces sont simplement des extensions des forces agissant à l'intérieur du matériel utilisé, et sont enfin de compte, responsables du phénomène d'adsorbat-adsorbant ou les forces qui maintiennent les particules sur la surface du solide jusqu'à saturation ou «l'équilibre d'adsorption» (Arris S., 2008).

I.6.1. L'adsorption des métaux lourds par la biomasse de liège

Des études ont été effectuées sur l'effet du prétraitement de la biomasse de liège sur l'adsorption des métaux lourds (Cu, Zn et Ni). Le prétraitement par la réaction de Fisher a confirmé le rôle important des groupements carboxyliques dans l'adsorption des métaux lourds. Le prétraitement de la biomasse de liège avec 0.5M de la solution de chlorure de sodium a mené à une augmentation de 30 % de la capacité d'adsorption de la poudre de liège au cuivre, tandis que le prétraitement avec une solution de chlorure de calcium 0.5M n'a pas amélioré significativement la performance de l'exécution de la biomasse.

Les travaux qui ont été effectués ont montré que la capacité d'adsorption de la biomasse de liège ne change pas après le bouillonnement de l'eau déionisée ou qui est lavée avec des solutions de 0.1M NaCl et NaOH, tandis que le bouillonnement dans des solutions alcalines a augmenté la quantité de cuivre adsorbé dans la biomasse. L'utilisation d'oxydants (NaClO et NaIO₃) dans l'étape de prétraitement a permis une augmentation de la capacité d'adsorption de

la biomasse. Par contre, une augmentation de 70-80 % de la capacité d'adsorption a été obtenue quand le prétraitement a été effectué pendant 30 minutes avec une solution contenant 7 % de chlore actif à température ambiante. Finalement, le carbone poreux produit de liège par activation directe avec vapeur à 700°et 800 °C a présenté une capacité d'adsorption de quatre à six fois plus haute que la biomasse de liège originale, en entrant en contact avec une solution de 200 mg/dm³ de cuivre (Chubar *et al.*, 2004).

1.6.2. L'étude de l'adsorption du cadmium dans un milieu synthétique par la biomasse de liège : Équilibre, études dynamiques et thermodynamiques

L'étude de l'adsorption du cadmium sur la poudre de liège réalisée par notre laboratoire chimie-environnement a montré que la poudre de liège est un excellent bioabsorbant. Il a été établi que ce biomatériau a une capacité d'adsorption acceptable vers l'ion métallique toxique. Le processus de biosorption a été étudié en ce qui concerne le temps de contact, la taille de particule, le pH et la température. Les résultats ont montré que l'équilibre a été atteint en une 1 heure. L'adsorption est favorisée par une augmentation de pH. Le pH optimum a été déterminé comme 6. À ce pH, le taux de déplacement d'ions de cadmium a été évalué à 64.48 %. On a observé également une augmentation de l'adsorption du cadmium en fonction de la diminution du diamètre du bioabsorbant dans la suspension. (Krika *et al.*, 2011).

I.7. La pharmacocinétique de la poudre de liège

Pour déterminer le devenir de la poudre de liège dans l'organisme, on s'est intéressé à ses constituants qui sont ; la subérine, la lignine, et les polysaccharides (la cellulose, l'hémicellulose). Sachant que la poudre de liège est insoluble dans l'eau et que ses trois constituants sont des fibres alimentaires cela veut dire qu'elle est une source de fibres alimentaires insolubles dans l'eau qui ne peut être digérée ou absorbée dans l'intestin grêle et parvient intacte dans le gros intestin.

En effet, les fibres alimentaires ingérées progressent le long du gros intestin où elles fermentent partiellement ou complètement sous l'effet des bactéries intestinales. Plusieurs sous-produits, des acides gras à chaîne courte (Acide acétique, acide propionique, acide butyrique), et des gaz (H₂, CO₂), et d'autres acides organiques tel que l'acide lactique se forment au cours du

processus de fermentation. C'est l'action combinée du processus de fermentation et des sous-produits ainsi formés qui contribue aux effets bénéfiques des fibres alimentaires sur la santé.

Les principaux effets physiologiques attribués aux fibres alimentaires concernent la fonction intestinale. (International Food Information Council (2008)).

I.8. Les effets pharmacologiques de la poudre de liège

En ce qui concerne les études effectuées sur la poudre de liège au niveau biologique très peu de recherches ont été effectuées. Nous avons retrouvé certains travaux qui indiquent qu'à une certaine époque, l'écorce du chêne-liège était utilisée dans la médecine ancienne. En décoction, elle était employée contre les maux de l'estomac et de l'intestin, ces effets physiologiques ont été attribués aux fibres alimentaires qu'elle contient. En poudre associée au henné, elle était utilisée en cataplasme contre la chute des cheveux. (Lahsissene *et al.*, 2009).

Par ailleurs et concernant l'effet antioxydant, des études ont été réalisées sur différentes extractions de la poudre de liège de *Quercus suber* L. et cela après deux fractionnements distincts, à savoir l'extraction par le méthanol/eau suivie par le fractionnement d'éther d'éthyle et l'extraction séquentielle avec le méthanol et l'eau. Les extraits ont été étudiés en termes de ses constituants phénoliques (la méthode Folin-Ciocalteu). L'HPLC-MME a permis d'identifier 15 composés phénoliques, parmi les quels l'acide ellagique suivi par des acides galliques et protocatechuiques était le plus abondant et plusieurs autres ont été rapportés pour la première fois comme des composants de liège (à savoir l'acide salicylique, la naringénine, eriodictyol, l'acide quinique et l'acide hydroxyphenyllactique).

Les extraits ont été évalués en termes de leurs propriétés antioxydantes, en utilisant l'hydrate de 2,2-diphényl-2-picrylhydrazyl (DPPH) (Sharma et Bhat, 2009). Le plus haut rendement a été obtenu par l'extraction d'eau constituant un résultat prometteur pour son exploitation dans des applications nutraceutiques, aussi pour la valorisation de liège comme une ressource renouvelable (Santos *et al.*, 2010).

Hormis ces quelques travaux sur les propriétés biologiques de la poudre de liège, aucun travail n'a fait référence sur les recherches de ses effets antioxydants et/ou pharmacologiques. Ceci montre d'une part l'originalité de notre étude et d'autre part la difficulté à trouver des références sur le sujet.



II. Matériel et Méthodes

Matériel

II.1. Partie galénique

II.1.1. Tamisage de la poudre de liège

L'analyse granulométrique nous a permis de séparer les différentes tailles de grains de la poudre de liège. Les dimensions de mailles et le nombre de tamis sont choisis en fonction de la nature de l'échantillon et de la précision attendue en respectant la norme actuelle (EN 933-2) qui préconise, pour l'analyse granulométrique, la série de tamis suivant en (mm): 0.063, 0.125, 0.25, 0.50, 1, 2, 4, 8, 16, 31.5, 63, 125. La poudre est agitée pendant environ 10 minutes. La vibration fait descendre les grains au travers des tamis jusqu'à ce qu'ils soient bloqués par le tamis de la maille correspondant au diamètre du grain.

Le but de notre tamisage est d'obtenir une poudre de diamètre ≤ 0.08 que nous avons récupéré dans le tamis ayant les mailles les plus étroites qui sont de 0.063 mm.

II.1.2. Lavage et séchage de la poudre de liège

La vibration n'est pas suffisante pour faire descendre les grains fines c'est-à-dire les grains d'un petit diamètre. Ces fines granules restent collées aux autres grains de plus grand diamètre. Puisque la vibration ne suffit pas pour avoir une poudre pure, trois à quatre lavages avec de l'eau distillée de notre échantillon ont été effectués jusqu'à l'obtention d'une eau claire permettant de se débarrasser des autres débris et de ne garder que la poudre de liège de diamètre ≤ 0.08 . La poudre ainsi obtenue de granulométrie très fine, a été séchée d'abord à l'air libre ensuite à l'étuve à 55°C pendant 72 heures.

II.2. Partie biologique

Le foie représente l'un des principaux organes de fixation des métaux lourds dont le cadmium et le plomb (Itokawa et al, 1974). Sachant que le foie joue un rôle barrière dans l'organisme car il y'a un accès immédiat aux substances provenant du tube digestif et véhiculées par la veine porte. Il intervient donc dans le métabolisme de nombreuses molécules et dans l'homéostasie (Brunet, 1999). Cette position augmente le risque de lésions hépatiques oxydatives dès le premier passage de substances nuisibles, ou après transformation métabolique par le foie de substances non toxiques en métabolites toxiques (Berthoin, 2000).

L'objectif de notre travail est l'évaluation *in vivo* de l'effet de la poudre de liège sur le stress oxydatif hépatique induit par le plomb et le cadmium. Ce travail a été effectué au niveau du laboratoire de toxicologie moléculaire à l'université de Jijel.

II.2.1. Entretien des animaux

L'étude a été réalisée sur des rats Wistar albinos males (Institut Pasteur d'Alger, Algérie), pesant environ 180- 220g. Les animaux sont répartis en 5 groupes. Ils ont libre accès à l'eau et à la nourriture. La température de l'animalerie est maintenue à 22°C, hygrométrie de 60% et un cycle le jour et la nuit de 12h-12h.

- **Lot témoin (3 rats):** Animaux témoins recevant l'eau distillée
- **Lot 1 (4 rats):** Animaux recevant 10mg/kg de (Pb(NO₃) + Cd Cl₂) par voie orale pendant 7 jours.
- **Lot 2 (4 rats):** Traitement curatif :
Animaux recevant 10mg/kg de (Pb(NO₃) + Cd Cl₂) par voie orale pendant 7 jours, ensuite traités avec 100mg/kg de poudre de liège par voie orale pendant 6 jours.
- **Lot 3 (3 rats):** Evaluation de la tolérance :
Animaux recevant 100mg/kg de poudre de liège par voie orale pendant 8 jours.
- **Lot 4 (3 rats) :** Traitement préventif :
Animaux traités par 100mg/kg de poudre de liège pendant 6 jours et recevant par la suite 10mg/kg de (Pb(NO₃) + Cd Cl₂) par voie orale pendant 6 jours.

II.2.2. Sacrifice des animaux et prélèvements des échantillons biologiques

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

Pour l'étude tissulaire, les animaux sont sacrifiés, après anesthésie par éther à différents intervalles de temps (entre 6 et 15 jours), ensuite, le foie est prélevé, rincé dans l'eau physiologique à 4°C puis coupé; un fragment est fixé dans le liquide de Duboscq Brazil pour l'examen histologique et le reste est congelé à (-20°C) pour réaliser les dosages tissulaires du stress oxydatif (MDA, GSH, SOD, et CAT).

Méthodes

II.1. Dosages biochimiques

II.1.1. Dosage de la 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 Jaffé (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 Biolabo au spectrophotmètre à 492 nm. La créatininémie est exprimée en mg/l.

II.1.2. Dosage des transaminases

Les transaminases sont des enzymes ayant une activité métabolique importante à l'intérieur des cellules hépatiques. Leur augmentation reflète une lésion cellulaire, en particulier au niveau hépatique, cardiaque, rénal ou musculaire. Les transaminases qui prédominent dans le foie sont :

Il y'a deux transaminases 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 chimiques qui se déroulent au niveau hépatique. Elles catalysent les réactions suivantes, en présence du coenzyme phosphopyridoxal :



➤ Condition de prélèvement

Le plasma est obtenu à partir de sang total recueilli sur héparinate de lithium. 10µl de plasma non hémolysé suffisent à réaliser chacune des mesures d'activité TGO ou TGP. Le dosage du taux des transaminases est mesuré automatiquement par l'automate (PHD Diam's 2300 +,

analyseur de biochimie, Européen union) à l'aide d'un kit Biolabo. Les résultats sont exprimés en UI/l. (Serge B.1985).

II.1.3. Dosages des phosphatases alcalines

Ce sont des monoestérases à large spécificité qui hydrolysent, entre autre, l'ester phosphorique du phosphore nitrophénol. La phosphatase alcaline se rencontre dans les tissus les plus variés : foie, épithélium biliaire, muqueuse intestinale, os, en premier lieu, mais aussi poumon, rein, globule rouge.

En pratique médicale courante, la phosphatase alcaline explore deux domaines très différents de la pathologie : d'une part le foie, et les voies biliaires ; d'autre part, le tissu osseux dans son ensemble. L'atteinte de ces organes provoque la libération de phosphates alcalins.

La phosphatase alcaline élevée dans le plasma de façon importante est durable et un argument majeur pour affirmer l'origine extra hépatique d'un ictère.

➤ Conditions de prélèvement et technique de mesure

Le plasma recueilli à partir du sang total, est prélevé sur héparinate de lithium, le dosage du taux de la phosphatase alcaline est mesuré à l'aide d'un spectrophotomètre à 410 nm. Les résultats sont exprimés en UI/l. (Serge B.1985).

II.2. Dosages tissulaires

II.2.1. Dosage du malondialdéhyde (MDA) cytosolique

Le MDA est l'un des produits terminaux formés lors de la décomposition des acides gras polyinsaturés (PUFA) médiées par les radicaux libres. Dans notre études, le taux du MDA hépatique a été évalué selon la méthode d'Ohkawa et al., 1979. Le dosage repose sur la formation en milieu acide et chaud (100°C) entre le MDA et deux thiobarbituriques (TBA) d'un pigment coloré absorbant à 530 nm, extractible par les solvants organiques comme le butanol.

L'homogénéisation des cellules hépatiques a été réalisée à froid dans du KCl 150 mM à raison de 1g de tissu dans 10 ml de KCl (chlorure de potassium).

Pour le dosage, à 0.5ml de la fraction cytosolique nous avons additionné 0.5 ml d'acide trichloracétique (TCA) 20% et 1 ml d'acide thiobarbiturique (TBA) 0.67%. Le mélange est

II. Matériel et Méthodes

chauffé à 100°C pendant 15 minutes, refroidi puis additionné de 4 ml de n-butanol. Après centrifugation de 15 minutes à 3000 tours/min, la densité optique est déterminée sur le surnageant au spectrophotomètre (Shimadzu, Japan) à 530 nm. La quantité du MDA dans l'échantillon est exprimée en nm/gramme de tissu (foie). Elle est obtenue grâce à une courbe standard réalisée avec du 1,1,3,3-tetraoxypropane dans les mêmes conditions.

II.2.2. Dosage du glutathion réduit hépatique

Le glutathion ou γ -L-glutamyl-L-cystéinglycine est un thiol intracellulaire le plus abondant présent dans toutes les cellules animales à des concentrations variables allant de 0.5 à 10 mM et de l'ordre du μ M dans le plasma. se compose de trois aminoacides (schéma 7) : l'acide glutamique, la cystéine et la glycine. De ces trois éléments, la cystéine est l'acide aminé essentiel à la synthèse du glutathion et la plus rare.

Le glutathion se trouve dans la cellule sous deux formes : une forme oxydée « GSSG » et une forme réduite « GSH » représentant plus de 99% de la quantité total.

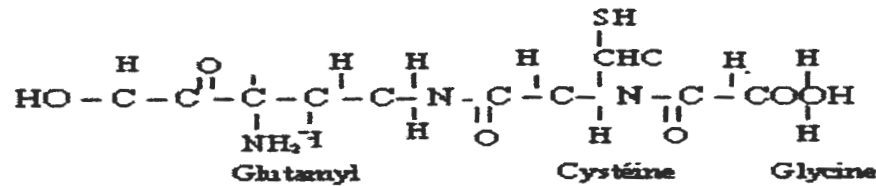


Figure 7 : Formule chimique du Glutathion réduit.

Pour le dosage du glutathion, la méthode colorimétrique par le réactif d'Ellman (DTNB) est la méthode la plus employée (Ellman, 1959). La réaction consiste à couper la molécule d'acide 5,5 dithiodis-2-nitrobenzoïque (DTNB) par le GSH, ce qui libère l'acide thionitrobenzoïque (TNB) lequel à pH (8-9) alcalin présente une absorbance à 412 nm selon la réaction suivante :

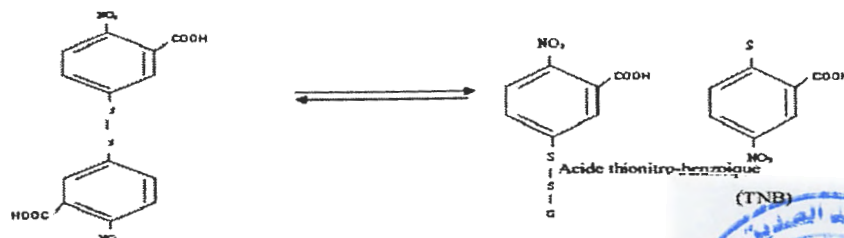


Figure 8: Reaction d'Ellman



II. Matériel et Méthodes

Pour évaluer le taux du glutathion, un gramme du foie est découpé, homogénéisé avec trois volumes de l'acide trichloracétique (TCA) (5 %) à l'aide d'un broyeur de DOUNCE, puis centrifugé à 2 000 rpm. Une aliquote de 50 μ L du surnageant est ensuite diluée dans 10 ml de tampon phosphate (0,1 M, pH = 8). À 3 ml du mélange de dilution, nous avons additionné 20 μ L DTNB (acide 5, 5'-dithiobis- 2-nitrobenzoic) (0,1 M).(5%).

La lecture de la densité optique est effectuée après 15 minutes d'incubation à 412 nm contre un blanc préparé dans les mêmes conditions avec le TCA 5%. Les concentrations du GSH dans l'échantillon sont exprimées en mm/gramme de tissu (foie). Elle est obtenue grâce à une courbe standard réalisée avec du GSH dans les mêmes conditions (Ellman, 1959).

II.2.3.Préparation de la fraction cytosolique

Pour la préparation de la fraction cytosolique ,1g du foie est prélevé et directement plongé dans trois volumes de tampon phosphate (0.1M à pH7.4) contenant du KCl 1.17%. Après découpage en morceaux fins et homogénéisation à l'aide du broyeur de DOUNCE, l'homogénat est centrifugé à 2000 rpm pendant 15 min à 4c° pour éliminer les débris nucléaires, le surnageant est ensuite centrifugé à 9600 rpm pendant 30 min à 4c°. Le surnageant final est utilisé comme source d'enzymes cytosoliques (Iqbal et al ; 2003).

II.2.3.1.Mesure de l'activité de la catalase cytosolique

Les catalases sont responsables de la dégradation d' H_2O_2 en H_2O et O_2 , empêchant donc cette molécule de participer à la réaction de Fenton. Elles sont localisées dans le peroxyosome des cellules de nombreux types tissulaires, mais sont particulièrement abondantes dans le foie et les globules rouges.

L'activité de la catalase cytosolique est déterminée selon la méthode de Clairborne, 1985. Le principe repose sur la disparition de l' H_2O_2 à 25°C par la présence de la source enzymatique dans la fraction cytosolique.

Le dosage est réalisé par la préparation dans une cuve de mesure en quartz, une solution substrat composée de 1 ml de tampon phosphate (KH_2PO_4 , 0,1 M, pH 7,4), 0,950 ml de H_2O_2 (0,019 M) et 0,025 ml de fraction cytosolique. La réaction est suivie par l'enregistrement

de l'absorbance à 240 nm chaque minute pendant deux minutes. L'activité de l'enzyme est exprimée en Unité/mg de protéine tissulaire (foie).

$$K = \frac{2.303}{T} \times \log \frac{A1}{A2}$$

- **K** : Constant de vitesse de la réaction
- **T** : Intervalle de temps
- **A1** : Absorbance dans le temps zéro
- **A2** : Absorbance après une minute

II.2.3.2. Mesure de l'activité de la SOD cytosolique

Les SODs sont capables d'éliminer l'anion superoxyde, première espèce toxique formée à partir de l'oxygène, par une réaction de dismutation. Elles assurent ainsi la première ligne de défense enzymatique contre le stress oxydant comme le montre la réaction :



L'activité de la SOD cytosolique est déterminée selon la méthode de (Beauchamp et Fridovich, 1971). Le principe repose sur la capacité de l'enzyme à inhiber la réduction du nitrobleu de tétrazolium (NBT) par l'anion superoxyde produit suite à la photoréaction de l'oxygène et de la riboflavine en présence d'un donneur d'électron comme la méthionine (Beauchamp et Fridovich, 1971).

Le dosage est réalisé dans un volume final de 2 ml. 5 µL de la source enzymatique ont été complétés à 2 mL du mélange réactionnel (*cyanide de sodium* $2 \cdot 10^{-5}$ M; *solution du NBT* $1,67 \cdot 10^{-4}$ M, *EDTA* $6,6 \cdot 10^{-3}$ M; *riboflavine* $2 \cdot 10^{-6}$ M; *méthionine* 10^{-2} M), puis le mélange a été irradié avec une lampe de 15 Watts pendant 10 minutes.

L'absorbance a été mesurée à 560 nm et les valeurs ont été exprimées en UI/mg de protéines. L'activité de l'enzyme est calculée selon l'équation suivante :

$$\text{Inhibition totale} = \frac{\text{Densité optique de blanc} - \text{Densité optique de l'échantillon}}{\text{Densité optique de blanc}} \times 100$$

SOD (UI/ μ l) = % d'inhibition \times 6.35

II.3. Mesure de la respiration mitochondriale du foie

II.3.1. Isolement des mitochondries

L'isolement des mitochondries repose sur une technique de fractionnement des composés cellulaires par centrifugation différentielle selon la méthode décrite par Rustin et al (1994).

Après le sacrifice, 10g de foie sont découpés en petits morceaux puis potérisés dans 30ml de tampon d'isolement TSE (250mM sucrose, 50 mM tris, 5mM EGTA, pH 7,2 à 4C°) à l'aide d'un Potter de Dounce (Kontes Glass Company, ISO-9001 steered firm. New jersey USA). L'homogénat récupéré est débarrassé des noyaux et gros débris cellulaires par une première centrifugation à 1770 rpm pendant 10mn à 4C° (Sigma model 6 k 15) puis une deuxième à 9600 rpm à 4C° pendant 10 mn.

Le culot ainsi obtenu est remis en suspension dans 30 ml du TSE puis centrifugé à 9600 rpm à 4C° pendant 10 mn. Le deuxième culot est suspendu dans 15 ml du tampon TS (250mM sucrose, 50mM tris, pH 7,2 à 4C°) et centrifugé à 4C° pendant 10 mn à 9600 rpm.

Le culot final est constitué des mitochondries, et est subdivisé en deux fractions égales: La première est récupéré dans 200 μ l du TS pour obtenir la suspension mitochondriale et la seconde dans 200 μ l de solution hypotonique (25mM KH₂PO₄; 5 mM Mgcl₂, pH 7,2) pour préparer la matrice mitochondriale qui sert à l'étude enzymatique.

II.3.2. Mesure de la respiration mitochondriale

La consommation en oxygène des suspensions mitochondriales au cours du temps et selon les additions de différentes solutions, est mesurée grâce à une électrode de Clark. Les mitochondries sont mises en suspension (1 mg/mL) sous agitation constante à 25°C dans du tampon de respiration (0,65 M mannitol; 0,36 mM EGTA; 5 mM Tris-Phosphate; 10 mM Tris- Maléate pH 6,8).

La respiration est initiée par l'addition du substrat du cycle de Krebs (6 mM) et la consommation de l'oxygène de cette étape détermine l'état 2 de la respiration. Les phosphorylations oxydatives sont amorcées par l'ajout de l'adénine dinucléotide phosphate,

ADP) 2 mM qui constitue l'état 3. Quand tout l'ADP est consommé, la respiration arrive en état 4.

Les vitesses de respiration (V_2 , V_3 , V_4) correspondants aux états 2, 3 et 4 ainsi mesurées sont exprimées en nano-atomes d'oxygène consommé $\text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$. Nous avons déterminé ainsi, le contrôle respiratoire ($CR_1 = V_2/V_3$ et $CR_2 = V_3/V_4$ ainsi que le P/O qui correspond à la synthèse d'ATP (Chance and Williams 1955).

II.4. Etude histologique

Au moment du sacrifice des animaux, les foies sont prélevés et excisés en petite pièces et immédiatement fixés dans du Dubosc Brazil (mélange micro-formolé) pour permettre la conservation morphologique des structures tissulaires et cellulaires et avoir une meilleure coloration histologique. Il faut 5 à 20 ml de fixateur pour un fragment qui mesure 1 à 2 cm. Les biopsies sont ensuite placées dans des cassettes préalablement numérotées afin de permettre la fixation des tissus dans du formol.

Pour la préparation des coupes histologiques, les biopsies hépatiques sont enrobées par passage de chaque prélèvement dans une série de bains d'alcools de concentrations croissantes (Sahander Citadel 2000, Thermo scientific, Germany) qui déshydratent et dissolvent les graisses figurées intra-tissulaires ensuite de permettre l'imprégnation de la paraffine dans le tissu. L'imprégnation a été effectuée grâce à un distributeur automatique de paraffine (Shandon Histocenter 3, Thermo electron corporation, Germany).

La coupe du bloc de paraffine au microtome (Leica, RM 2125 RT) nous a permis de réaliser des coupes très fines de 2 microns d'épaisseur. Les coupes ainsi obtenus sont déposées et collées sur des lames de verre.

Enfin, les coupes histologiques ont été déparaffinées au xylène et réhydratées dans des bains d'alcools de concentrations décroissantes. Pour permettre la mise en évidence des différentes structures tissulaires et cellulaire, les coupes obtenues ont été colorées par hématoxyline/éosine(HE) (Shandon Varistain 24- 4, Thermo electron corporation, Germany) et un colorant cytoplasmique (éosine).

L'examen au microscope optique permettant l'évaluation des changements pathologiques tissulaires du foie a été réalisée après montage de la préparation sous lamelle.

II.5. Etude statistique

Les résultats graphiques sont présentés sous formes de moyenne et d'écart-type. L'évaluation statistique est effectuée en comparant les moyennes des groupes traités par les métaux lourds à celles des groupes témoins d'une part, et d'autre part à celles traités par les métaux lourds plus la poudre de liège, celles traités seulement par la poudre de liège mais aussi, le groupe traités par poudre de liège plus métaux lourds en utilisant le test T de Student :

- $P > 0,05$: la différence n'est pas significative.
- $P < 0,05$: la différence est significative (*).
- $P < 0,01$: la différence est très significative (**).
- $P < 0,001$: la différence est hautement significative (***)

III. Résultats et Discussion

Résultats

III.1. Résultats des analyses biochimiques

III.1.1. Evaluation des taux de TGP plasmatique

La figure 9 représente la variation des taux de TGP plasmatique chez des rats sains et des rats rendus malades par la coexposition au plomb et au cadmium traités par la poudre de liège en curatif et en préventif.

Nous avons enregistré une augmentation significative de 82.65% chez les rats traités par le mélange plomb et cadmium des TGP plasmatiques (106.21 ± 21.25 UI/l contre 18.43 ± 3.37 UI/l pour le control, $p < 0.01$). Par contre chez les rats pathologiques traités pendant 6 jours par la poudre en curatif et en préventif avec une dose quotidienne de 100 mg/kg nous avons constaté une légère réduction non significative de 20.53% et de 12.72% respectivement par rapport au 1^{er} lot ; mais qui restent supérieurs aux normes thérapeutiques. En effet le taux de TGP reste supérieur à celui des rats sains témoins (84.4 ± 21.98 UI/l contre 18.43 ± 3.37 UI/l) en curatif et (92.7 ± 12.48 UI/l contre 18.43 ± 3.37 UI/l) en préventif.

D'autre part, nous avons enregistré une légère augmentation mais non significative de 34.88% des taux de TGP plasmatique chez les rats sains traités pendant 8 jours par la poudre de liège seule par rapport au lot témoins sains qui reste toutefois dans la limite des normes thérapeutiques (5 à 35 UI/l).

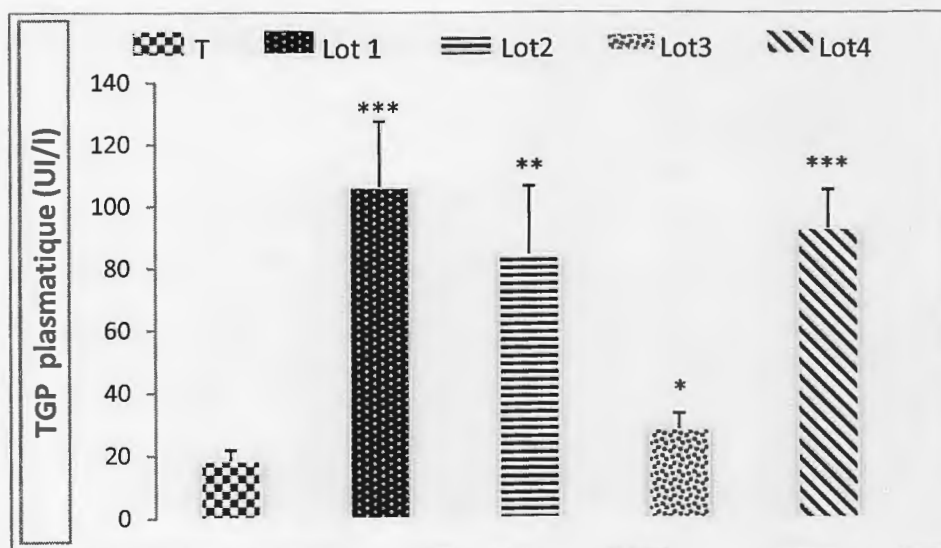


Figure 9 : Variation des taux de TGP plasmatique chez les rats témoins(sains) ;les rats recevant une dose journalière de 10mg/kg (Pb(NO₃)+ Cd Cl₂) pendant 7 j, les rats recevant une dose journalière de 10mg/kg de Pb(NO₃+ Cd Cl₂) pendant 7j puis traité par la poudre de liège (100mg/kg) pendant 6j ; les rats recevant une dose de 100mg/kg de la poudre de liège et les rats traités par la poudre de liège (100mg/kg) pendant 6j + 6j de métaux

10mg/kg (Pb(NO₃)+Cd Cl₂). Les valeurs sont exprimées en moyennes ± écart type et une significativité statistique p<0.05 : significatif(*), p<0.01 : hautement significatif (*), p<0.001 : très hautement significatif (***)).

III.1.2. Evaluation des taux de TGO plasmatique

La figure 10 représente la variation des taux de TGO plasmatique chez des rats sains et des rats rendus malades par la coexposition au plomb et au cadmium traités par la poudre de liège en curatif et en préventif. Les TGO suivent le même profil que les TGP avec une augmentation de 48.50% dans le groupe de rats traités par le plomb et le cadmium : 55 ± 6.98 UI/l contre 28.33 ± 6.51 UI/l chez le témoin, p<0.01). Les TGO des animaux recevant 6J de poudre en curatif et préventif à la dose quotidienne de 100 mg/kg restent supérieurs à ceux enregistrés chez les témoins sains (norme thérapeutique; 5 à 40UI/l).

D'autre part, chez les rats sains traités pendant 8 jours par la poudre de liège les TGO restent dans les normes thérapeutiques.

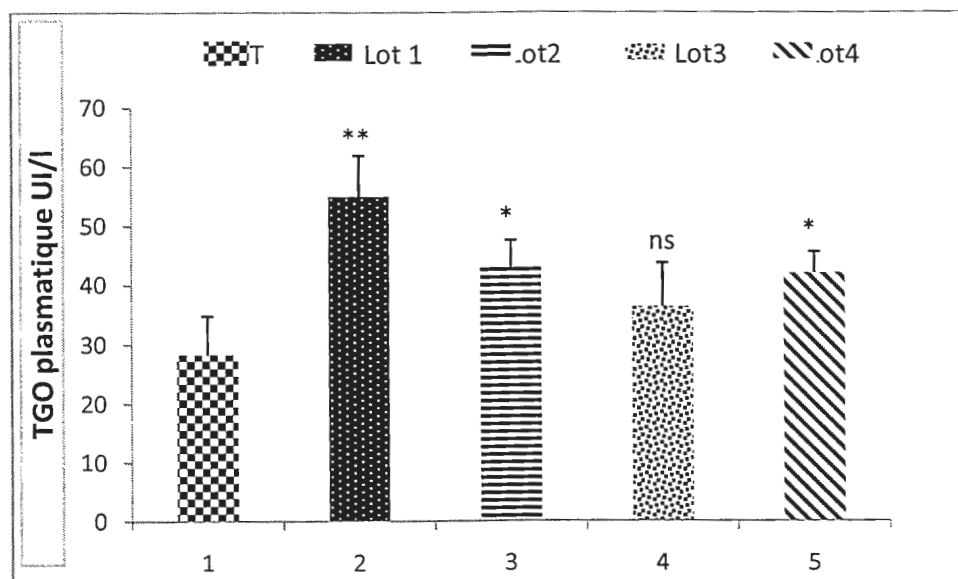


Figure 10 : Variation des taux de TGO plasmatique chez les rats témoins(sains) ;les rats recevant une dose journalière de 10mg/kg (Pb(NO₃)+ Cd Cl₂) pendant 7 j, les rats recevant une dose journalière de 10mg/kg de (Pb(NO₃)+ Cd Cl₂) pendant 7j puis traité par la poudre de liège (100mg/kg) pendant 6j ; les rats recevant une dose de 100mg/kg de la poudre de liège et les rats traités par la poudre de liège (100mg/kg) pendant 6j + 6j de métaux 10mg/kg (Pb(NO₃)+Cd Cl₂). Les valeurs sont exprimées en moyennes ± écart type et une significativité statistique p<0.05 : significatif(*), p<0.01 : hautement significatif (*), p<0.001 : très hautement significatif (***)).

III.1.3. Evaluation des taux des PAL plasmatique

La figure 11 représente la variation des taux des PAL plasmatique chez des rats sains et des rats rendus pathologiques par la coexposition au plomb et au cadmium traités par la poudre de liège en curatif et en préventif. Ils sont augmentés dans le lot traité par le plomb et cadmium (482.25 ± 22.75 UI/l contre 154.33 ± 8.62 UI/l chez les témoins sains, $p \leq 0.01$). Par contre, dans les groupes pathologiques traités pendant 6 jours par la poudre de liège en curatif et préventif avec une dose quotidienne de 100 mg/kg, nous avons constaté une diminution des taux des PAL plasmatique de 69.05% et de 56.10% respectivement par rapport au 1^{er} lot.

D'autre part, on note une légère augmentation non significative de 47.52% du taux des PAL chez les rats sains traités pendant 8 jours par la poudre de liège.

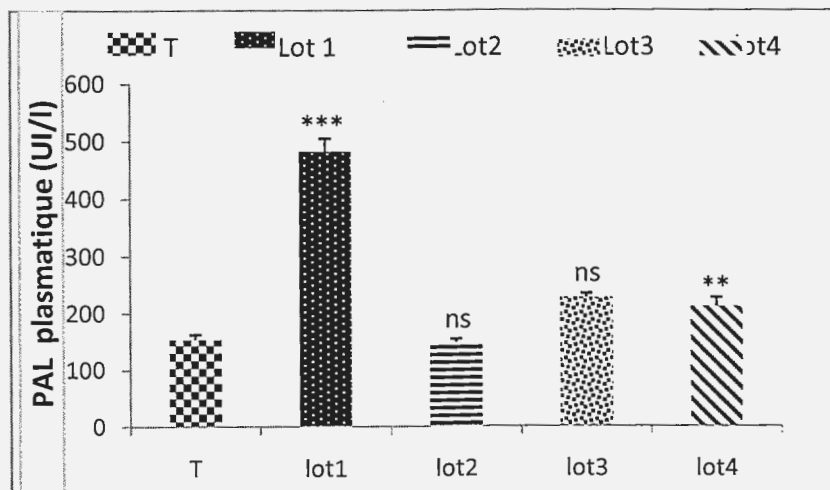


Figure 11 : Variation des taux des PAL plasmatique chez les rats témoins (sains) ; les rats recevant une dose journalière de 10mg/kg ($Pb(NO_3) + Cd Cl_2$) pendant 7 j, les rats recevant une dose journalière de 10mg/kg de ($Pb(NO_3) + Cd Cl_2$) pendant 7j puis traité par la poudre de liège (100mg/kg) pendant 6j ; les rats recevant une dose de 100mg/kg de la poudre de liège et les rats traités par la poudre de liège (100mg/kg) pendant 6j + 6j de métaux 10mg/kg ($Pb(NO_3) + Cd Cl_2$). Les valeurs sont exprimées en moyennes \pm écart type et une significativité statistique $p \leq 0.05$: significatif (*), $p \leq 0.01$: hautement significatif (*), $p \leq 0.001$: très hautement significatif (***).

III.1.4. Evaluation de la tolérance de la poudre de liège

a). La fonction hépatique :

La figure 12 représente les paramètres biochimiques de l'activité hépatique chez les rats sains et ceux traité par la poudre de liège. Nous avons constaté une légère augmentation chez les rats traités par la poudre de liège dans les paramètres TGO, PAL (36.33 ± 7.37 UI/l contre

III. Résultats et Discussion

28.33±6.51UI/l) et (227.67±7.09 UI/l contre 154.33±8.62 UI/l) par rapport à celui enregistré chez les témoins sains.

Pour ce qui concerne les TGP et la bilirubine aucun changement n'a été observé (28.3 ± 5 UI/l contre 30.43 ± 3.37 UI/l chez les témoins sains) et (5± 2.5 UI/l contre 6± 3.2 UI/l chez les témoins sains). Le traitement pendant 8 jours par la poudre de liège, n'a révélé aucun changement significatif au niveau des paramètres de la fonction hépatique. On peut dire alors que la poudre de liège est tolérable et n'a aucun effet hépatotoxique.

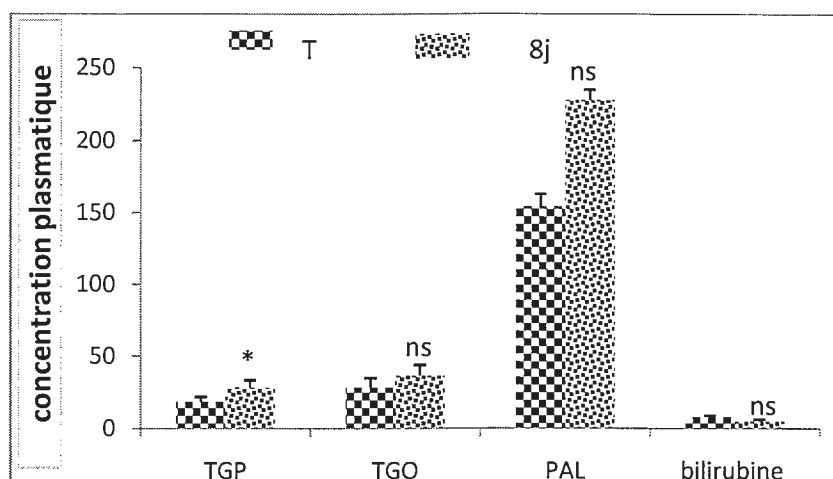


Figure 12 : Valeurs des paramètres biochimiques de la fonction hépatique, chez les rats témoins (sains) et les rats traités avec une dose journalière de 100mg/kg de la poudre de liège pendant 8 jours. Les valeurs sont exprimées en moyennes ± écart type et une significativité statistique $p \leq 0.05$: significatif (*), $p \leq 0.01$: hautement significatif (**), $p \leq 0.001$: très hautement significatif (***).

b). La fonction rénale

La figure 13 représente les paramètres biochimiques de l'activité rénale chez les rats sains et ceux traités par la poudre de liège.

Nous n'avons constaté aucun changement de la créatinine ni de l'urée chez les rats traités par la poudre de liège par rapport à celle enregistré chez les témoins sains. Pour ce qui concerne la créatinine elle est de 7 ± 2.5 mg/l contre 6 ± 2.3 mg/l chez les témoins sains. Pour l'urée, elle est de 0.31 ± 0.1 g/l contre 0.34 ± 0.09 g/l chez les témoins sains.

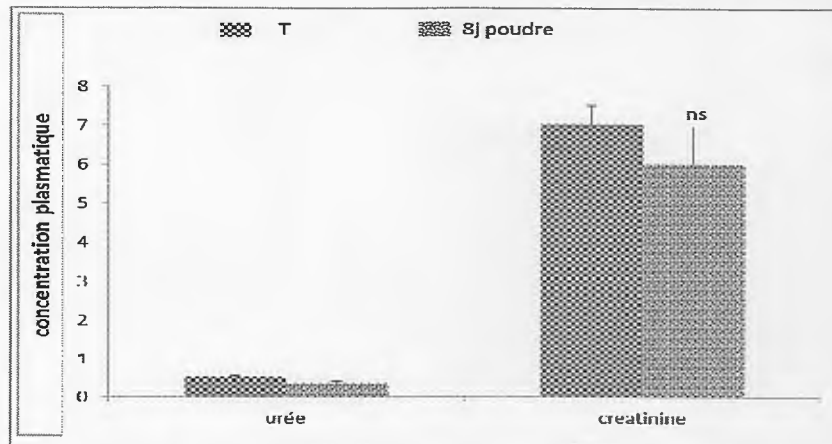


Figure 13 : Variation des paramètres biochimiques de la fonction rénale, chez les rats témoins (sains) et les rats traités par une dose journalière de 100mg/kg de la poudre de liège pendant 8 jours. Les valeurs sont exprimées en moyennes \pm écart type et une significativité statistique $p \leq 0.05$: significatif(*), $p \leq 0.01$: hautement significatif (*), $p \leq 0.001$: très hautement significatif (***)

III.2. Résultats du dosage tissulaire

III.2.1. Evaluation de la peroxydation lipidique cytosolique hépatique

Les concentrations en MDA ont été déterminées sur des fractions cytosoliques du foie. La figure 14 représente la variation du taux hépatique en MDA chez des rats sains et des rats rendus malades par la coexposition au plomb et au cadmium traités par la poudre de liège en curatif et en préventif.

Nous avons constaté une augmentation significative du MDA hépatique chez les rats du 1^{er} lot (exposés à des doses de plomb et de cadmium de 10 mg/kg) par rapport aux rats témoins. Cette augmentation est de l'ordre de 40 % dans le foie (30.16 ± 2.52 $\mu\text{mole/g}$ de tissu contre 18.11 ± 0.11 $\mu\text{mole/g}$ de tissu chez les témoins sains). Par contre un traitement de 6 jours par la poudre de liège a baissé le taux du MDA hépatique de 17.84% chez les rats de 3^{ème} et 4^{ème} lots par rapport aux rats du 2^{ème} lot pathologique. En effet ces taux restent légèrement supérieurs à ceux des rats témoins (24.78 ± 3.2 $\mu\text{mole/g}$ de tissu contre 18.11 ± 0.11 $\mu\text{mole/g}$ de tissu) pour le 3^{ème} lot et (25.34 ± 2.01 $\mu\text{mole/g}$ de tissu contre 18.11 ± 0.11 $\mu\text{mole/g}$ de tissu) pour le 4^{ème} lot mais l'étude statistique des résultats n'a révélé aucune différence significative.

Chez les rats sains, un traitement de 8 jours de la poudre de liège n'a révélé aucun changement significatif de la concentration hépatique en MDA.

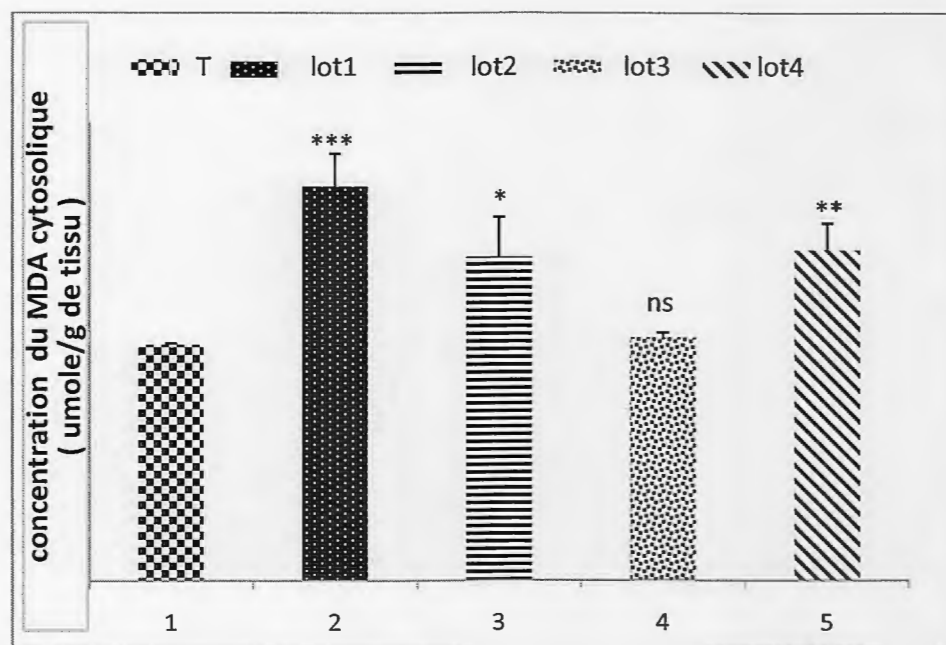


Figure 14 : Variation des taux du MDA cytosolique hépatique chez les rats témoins (sains) ; les rats recevant une dose journalière de 10mg/kg (Pb(NO₃)+ Cd Cl₂) pendant 7 j, les rats recevant une dose journalière de 10mg/kg de (Pb(NO₃)+ Cd Cl₂) pendant 7j puis traité par la poudre de liège (100mg/kg) pendant 6j ; les rats recevant une dose de 100mg/kg de la poudre de liège et les rats traités par la poudre de liège (100mg/kg) pendant 6j + 6j de métaux 10mg/kg (Pb(NO₃)+Cd Cl₂). Les valeurs sont exprimées en moyennes ± écart type et une significativité statistique p < 0.05 : significatif (*), p < 0.01 : hautement significatif (*), p < 0.001 : très hautement significatif (***).

III.2.2. Evaluation des taux de glutathion cytosolique hépatique

La figure 15 représente la variation du taux hépatique en GSH chez des rats sains et des rats rendus malades par la coexposition au plomb et au cadmium traités par la poudre de liège en curatif et en préventif.

Nous avons constaté une diminution significative dans le taux du GSH hépatique chez les rats du lot traité par un mélange de plomb et de cadmium, 7.05 ± 0.51 $\mu\text{mole/g}$ de tissu contre 10.77 ± 0.09 $\mu\text{mole/g}$ de tissu chez les rats sains, $p < 0.01$. Par contre chez les rats pathologiques traités par 6J de poudre en curatif et préventif avec une dose quotidienne de 100 mg/kg nous avons constaté une légère augmentation non significatif du taux du GSH hépatique de 16.57% dans le foie. En effet le taux de GSH reste inférieur à celui des rats sains témoins (8.45 ± 1.26 $\mu\text{mole/g}$ de tissu contre 10.77 ± 0.09 $\mu\text{mole/g}$ de tissu) en curatif et (8.09 ± 0.46 $\mu\text{mole/g}$ de tissu contre 10.77 ± 0.09 $\mu\text{mole/g}$ de tissu) en préventif. D'autre part, chez les rats sains traités

pendant 8 jours par la poudre de liège, n'a révélé aucun changement significatif dans le taux de GSH hépatique.

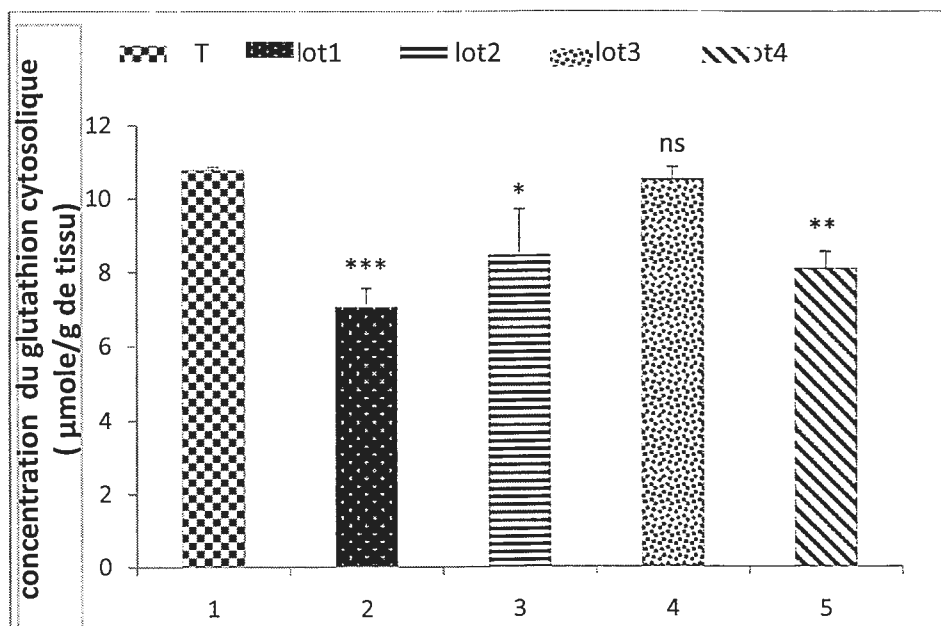


Figure 15 : Variation des taux de GSH cytosolique hépatique chez les rats témoins (sains) ; les rats recevant une dose journalière de 10mg/kg ($Pb(NO_3) + Cd Cl_2$) pendant 7 j, les rats recevant une dose journalière de 10mg/kg de ($Pb(NO_3) + Cd Cl_2$) pendant 7j puis traité par la poudre de liège (100mg/kg) pendant 6j ; les rats recevant une dose de 100mg/kg de la poudre de liège et les rats traités par la poudre de liège (100mg/kg) pendant 6j + 6j de métaux 10mg/kg ($Pb(NO_3) + Cd Cl_2$). Les valeurs sont exprimées en moyennes \pm écart type et une significativité statistique $p < 0.05$: significatif (*), $p < 0.01$: hautement significatif (*), $p < 0.001$: très hautement significatif (***).

III.2.3. Evaluation de l'activité enzymatique de la SOD cytosolique hépatique

L'activité de la SOD a été déterminée sur une fraction cytosolique du foie. La figure 16 représente la variation de l'activité de la SOD dans le foie des rats sains et des rats rendus malades par la coexposition au plomb et au cadmium.

Dans notre étude nous avons constaté une augmentation significative de l'activité SOD du foie de rats traités par la coexposition au plomb et au cadmium ($P < 0.001$). Cette augmentation est de 83.65% (25.38 ± 1.98 UI/ μ l contre 4.15 ± 2.59 UI/ μ l chez les rats sains).

Par contre un traitement de 6 jours par la poudre de liège a provoqué une diminution significative de l'activité de la SOD au niveau hépatique chez les rats traités par la poudre en préventif et en curatif par rapport à celle enregistré chez les rats du 1^{er} lot non traités par la poudre $p < 0.001$ (15.29 ± 3.88 UI/ μ l contre 25.38 ± 1.98 UI/ μ l) en curatif et (15.70 ± 3.69 UI/ μ l contre 25.38 ± 1.98 UI/ μ l) en préventif.

III. Résultats et Discussion

Cependant, l'activité de la SOD reste supérieure à celle observé chez les rats sains témoins. D'autre part, chez les rats sains traités pendant 8 jours par la poudre de liège, n'a révélé aucun changement significatif dans l'activité enzymatique de la SOD au niveau hépatique.

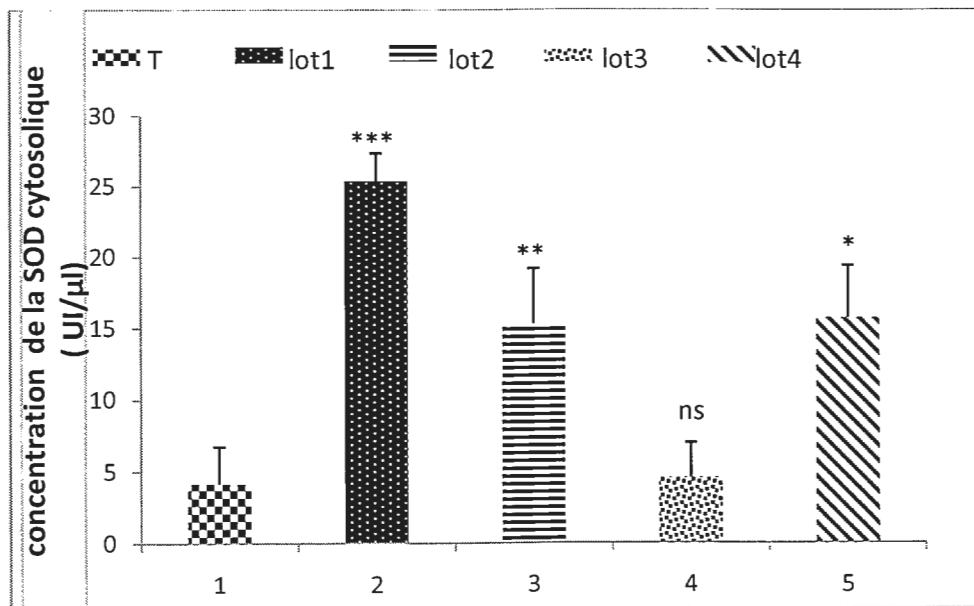


Figure 16 : Variation de l'activité enzymatique de la SOD cytosolique hépatique chez les rats témoins(sains) ;les rats recevant une dose journalière de 10mg/kg (Pb(NO₃)+ Cd Cl₂) pendant 7 j, les rats recevant une dose journalière de 10mg/kg de(Pb(NO₃)+ Cd Cl₂) pendant 7j puis traité par la poudre de liège (100mg/kg) pendant 6j ; les rats recevant une dose de 100mg/kg de la poudre de liège et les rats traités par la poudre de liège (100mg/kg) pendant 6j + 6j de métaux 10mg/kg (Pb(NO₃)+Cd Cl₂). Les valeurs sont exprimées en moyennes ± écart type et une significativité statistique $p \leq 0.05$: significatif(*), $p \leq 0.01$: hautement significatif (*), $p \leq 0.001$: très hautement significatif (***)

III.2.4. Evaluation de l'activité enzymatique de la catalase cytosolique hépatique

La figure 17 représente les résultats de l'influence d'un traitement de 6j par la poudre de liège sur l'activité de la catalase dans le foie des rats sains et des rats rendus malade par une coexposition au plomb et cadmium.

Une réduction significative de 84.74% $p \leq 0.001$ de l'activité de la CAT au niveau du foie chez les rats du premier lot traité par un mélange de plomb et de cadmium (0.29 ± 0.09 UI contre 1.9 ± 1.08 UI) a été enregistré chez les rats sains. Cette réduction est à l'ordre de 84.74% dans le foie. Par contre un traitement 6 jours par la poudre de liège en préventif et curatif a provoqué une augmentation de 75.21 % $p \leq 0.01$ de l'activité de la CAT au niveau hépatique chez les rats exposés à des concentrations en plomb et cadmium (1.17 ± 0.61 UI contre 1.9 ± 1.08 UI) en curatif et (1.74 ± 0.69 UI contre 1.9 ± 1.08 UI) en préventif.

III. Résultats et Discussion

Nous avons également constaté que chez les rats sains traités pendant 6 jours par la poudre de liège l'activité de la catalase (CAT) dans le foie n'a pas changé de façon significative par rapport à celle enregistré chez les rats sains témoins.

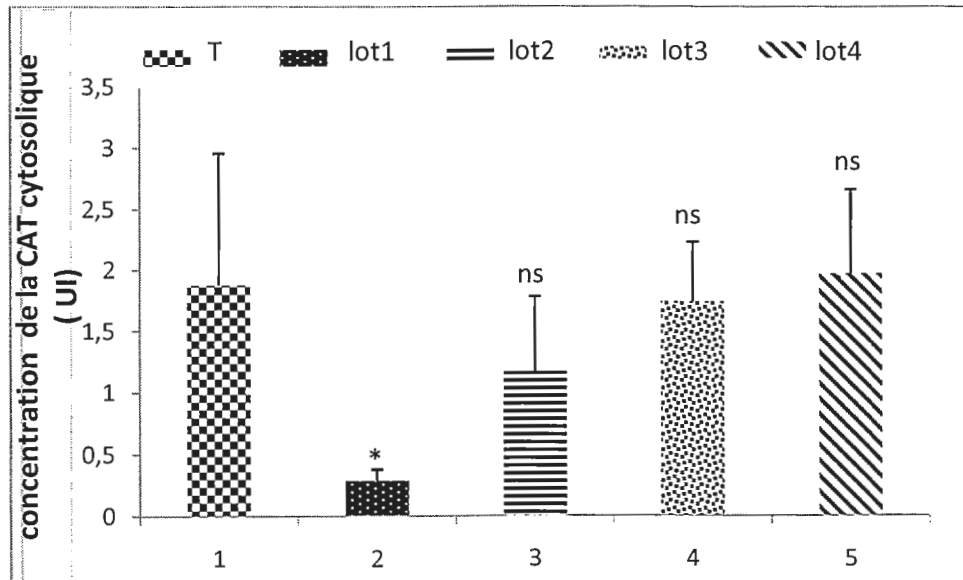


Figure17 : variation de l'activité enzymatique de la CAT cytosolique hépatique chez les rats témoins(sains) ;les rats recevant une dose journalière de 10mg/kg (Pb(NO₃)+ Cd Cl₂) pendant 7 j, les rats recevant une dose journalière de 10mg/kg de(Pb(NO₃)+ Cd Cl₂) pendant 7j puis traité par la poudre de liège (100mg/kg) pendant 6j ; les rats recevant une dose de 100mg/kg de la poudre de liège et les rats traités par la poudre de liège (100mg/kg) pendant 6j + 6j de métaux 10mg/kg (Pb(NO₃)+Cd Cl₂). Les valeurs sont exprimées en moyennes ± écart type et une significativité statistique $p \leq 0.05$: significatif(*), $p \leq 0.01$: hautement significatif (*), $p \leq 0.001$: très hautement significatif (***)

III.3. Résultats de la respiration mitochondriale du foie

La mitochondrie étant la source principale de production des espèces oxygénées radicalaires donc responsables du stress oxydatif, le suivi de l'effet des produits étudiés seraient importants dans l'explication de leurs rôles dans ce processus toxique aussi bien les métaux (plomb et cadmium) que la poudre de liège (substance végétale naturelle). Les résultats de l'effet de ces substances sur la fonctionnalité de la mitochondrie de foie de rat obtenus sont regroupés dans le tableau 2 et les figures 18-20 ci-après.

Nous pouvons retenir deux effets importants ; les métaux entraînent un arrêt des phosphorylations oxydatives mitochondriales d'une part et son renversement par la poudre de liège. En effet, on peut constater que le contrôle respiratoire est au plus bas (CR1 et CR2 environ

III. Résultats et Discussion

1.86 contre 7.52 chez le témoin). La poudre améliore le CR1 sans toutefois avoir d'effet sur le CR2. Par ailleurs, la poudre seule n'a pas d'effet sur la respiration mitochondriale ce qui serait en faveur d'une bonne tolérance par le foie de ce produit naturel.

Tableau 2: Effet de la mixture plomb-cadmium (1mM) en présence ou non de poudre de liège (1/10è) sur la respiration mitochondriale de foie de rat. CR1=V3/V2, CR2=V3/V4.

| | Vitesse2 | Vitesse3 | Vitesse4 | CR1 | CR2 | P/O |
|--------------------------------|----------|----------|----------|------|------|-------|
| Témoin 1 | 41,05 | 302,04 | 91,81 | 7,35 | 3,28 | 4,96 |
| Témoin 2 | 41,84 | 295,90 | 91,81 | 7,07 | 3,22 | 4,89 |
| Témoin 3 | 32,30 | 243,13 | 125,85 | 7,52 | 1,93 | 3,33 |
| Pb+ Cd 1mM | 13,20 | 24,62 | 20,86 | 1,86 | 1,18 | 43,05 |
| Pb+ Cd 1mM | 30,00 | 29,30 | 23,47 | 0,97 | 1,24 | 16,70 |
| Pb+ Cd 1mM | 12,10 | 23,42 | 20,86 | 1,86 | 1,15 | 39,12 |
| Poudre liège 1/10è | 61,20 | 211,5 | 196,95 | 3,45 | 1,07 | 5,59 |
| Poudre liège 1/10è | 52,00 | 195,2 | 176,85 | 3,75 | 1,10 | 3,89 |
| Poudre liège 1/10è | 56,03 | 225,4 | 199,20 | 4,02 | 1,13 | 4,25 |
| Poudre liège 1/10è + Pb/Cd 1mM | 32,10 | 170,7 | 167,65 | 5,31 | 1,02 | 4,01 |
| Poudre liège 1/10è + Pb/Cd 1mM | 38,02 | 165,2 | 146,81 | 4,34 | 1,13 | 4,88 |
| Poudre liège 1/10è + Pb/Cd 1mM | 46,08 | 182,4 | 168,20 | 3,95 | 1,08 | 4,33 |

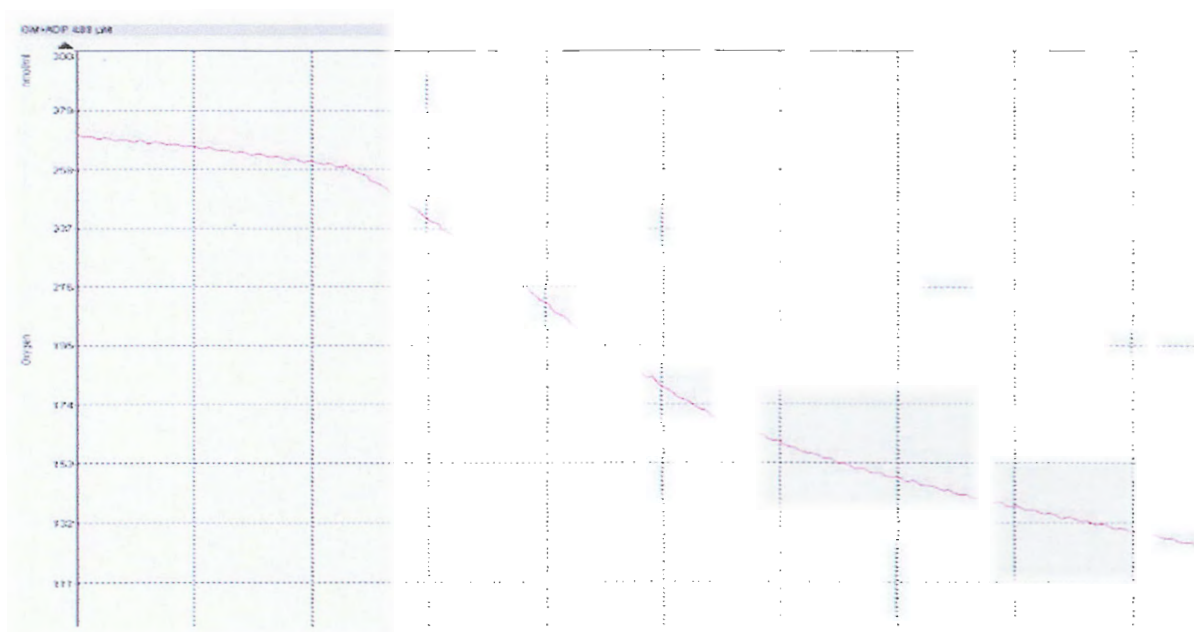


Figure 18 : Respiration mitochondriale chez un rat témoin

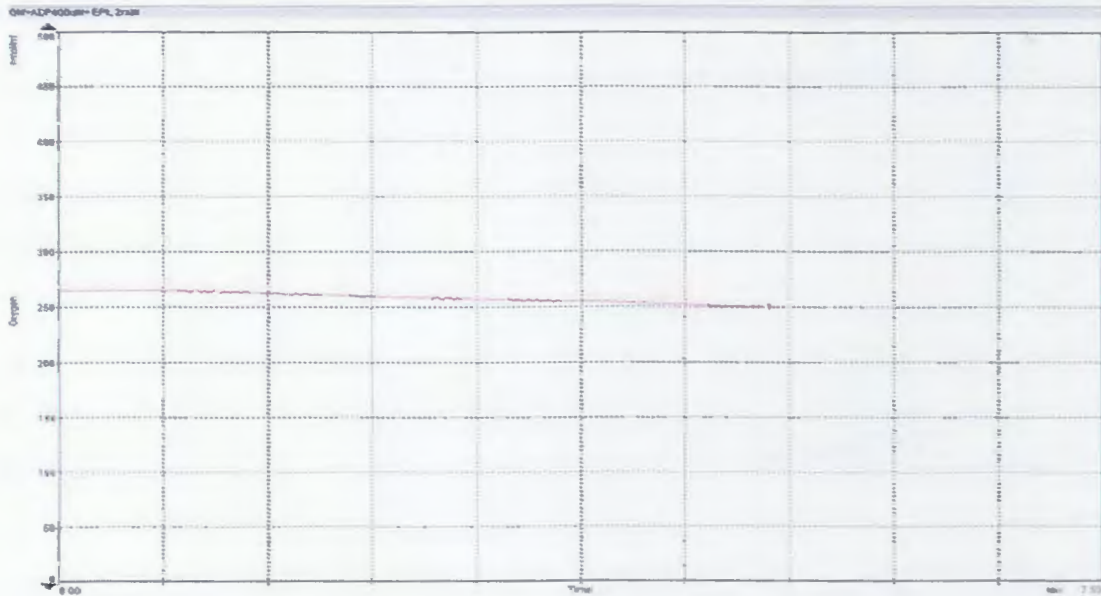


Figure 19 : Effet de la mixture plomb-cadmium (1mM) sur la respiration mitochondriale

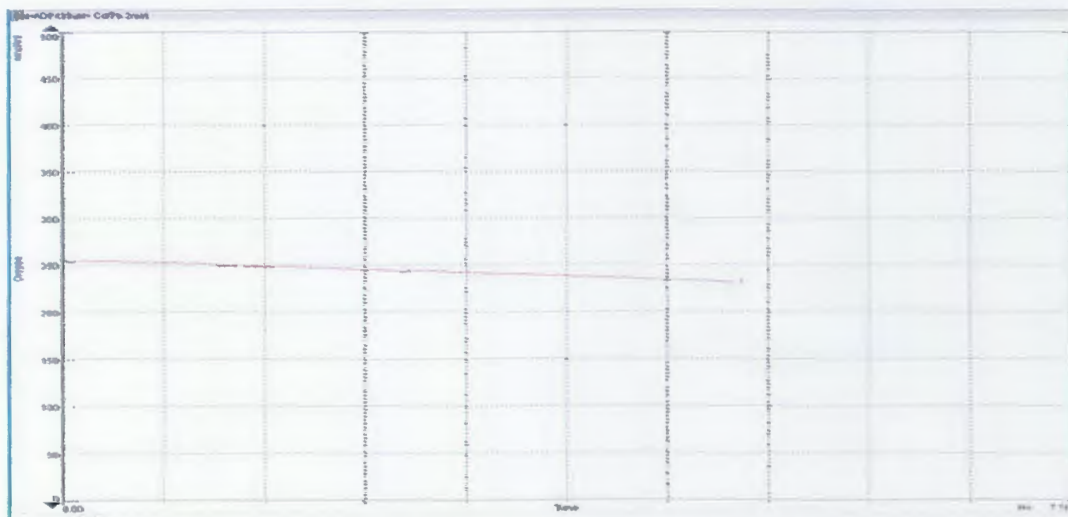


Figure 20 : Effet de la mixture plomb-cadmium (1mM) en présence de poudre de liège ($1/10^{5ème}$) sur la respiration mitochondriale.

III.4. Résultats de l'étude histologique

L'observation de coupes histologiques de foie de rats dans différentes conditions expérimentales laisse apparaître des différences significatives entre les rats traités par rapport aux animaux contrôles. En effet, le traitement quotidien par l'association plomb et cadmium

III. Résultats et Discussion

10mg/kg pendant 7 jours provoque des nécroses cellulaires assez marquées (figure 21). Des nécroses en majorité périportale, parfois péricentrolobulaire et accompagnées le plus souvent d'inflammations sinusoidales assez importantes. On observe également des vacuolisations éparses ainsi qu'une stéatose macrocytaire. Ces altérations histologiques témoignent de l'effet toxique des métaux lourds sur le foie et confirment aussi les résultats biochimiques et du stress qu'ils induisent.

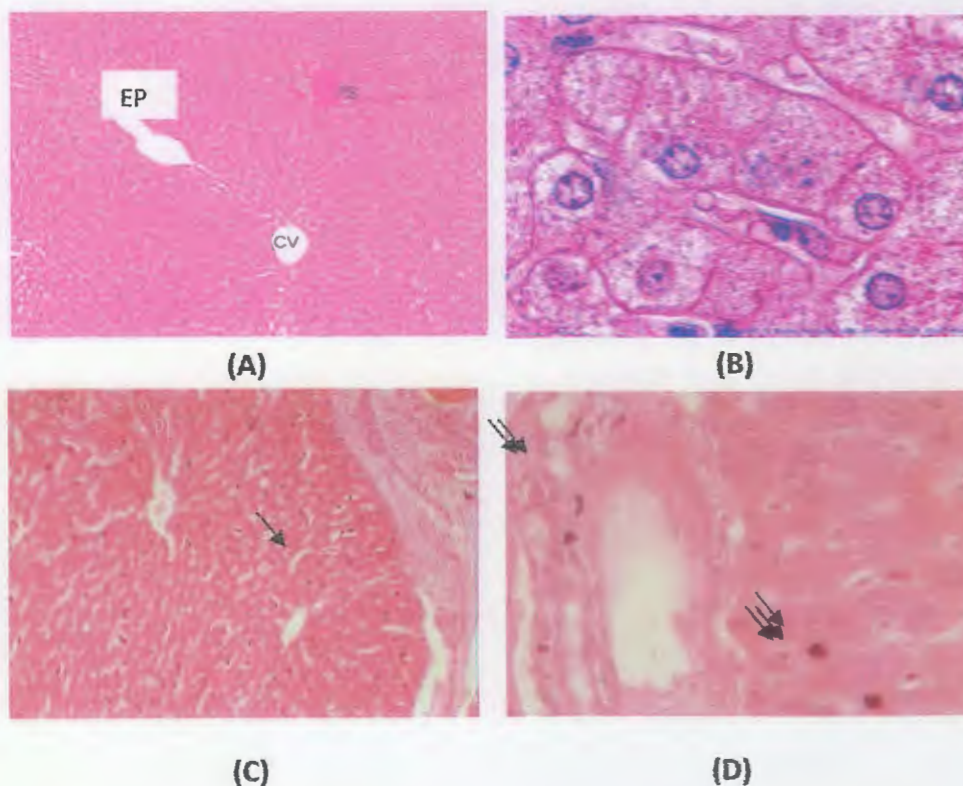


Figure 21: Micrographie de l'examen histopathologique de coupes de foie colorées à hématoxyline/éosine de rats témoins (A ; G x 40 et B ; G x1000) montrant un parenchyme hépatique bien lobulé avec une veine centrolobulaire (cv), un espace porte (EP) et des cellules très bien délimitées avec un noyau centrale. En (C ; G x100 et D ; G x400) celles de rats traités recevant une dose journalière de 10mg/kg ($Pb(NO_3)_2 + CdCl_2$) pendant 7 j montrant une inflammation sinusoidale (flèche), stéatose (double flèche) et nécrose (triple flèche).

La poudre de liège administrée avant ou après le traitement des animaux par l'association plomb-cadmium, n'a pas restauré de manière significative les modifications histologiques hépatiques induites par les métaux lourds (figure 22). Même quand elle est administrée seule, cette poudre de liège provoque une stéatose microvésiculaire bien présente sur les coupes histologiques (figure 23). Ceci serait du probablement à son interférence avec le métabolisme des lipides au niveau cellulaire.

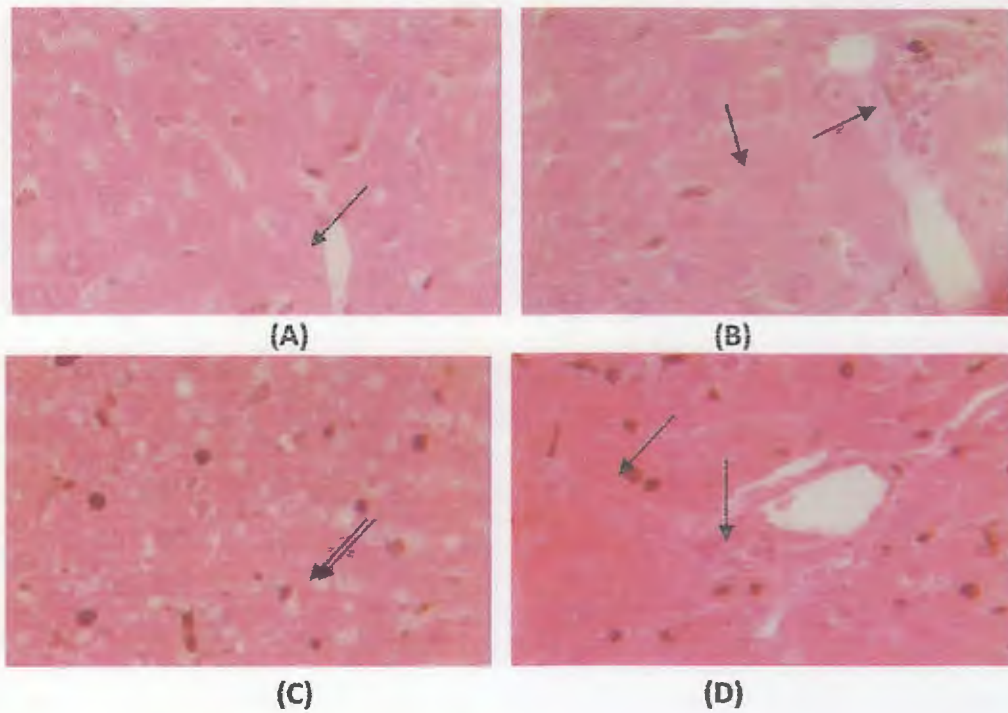


Figure 22 : Micrographie de l'examen histopathologique de coupes de foie colorées à hématoxyline/éosine de rats recevant une dose journalière de 10mg/kg de ($Pb(NO_3)_2 + CdCl_2$) pendant 7j puis traité par la poudre de liège (100mg/kg) pendant 6j (A et B) avec en (A) ; G x400 une inflammation sinusoidale (flèche) accompagnée d'une fibrose portale et des foyers de nécroses (B ; G x400). En (C et D ; G x400) les rats traités par la poudre de liège (100mg/kg) pendant 6j + 6j de métaux 10mg/kg ($Pb(NO_3)_2 + CdCl_2$) montrant les mêmes modifications qu'en A et B avec en plus d'une stéatose microvésiculaire (double flèche).

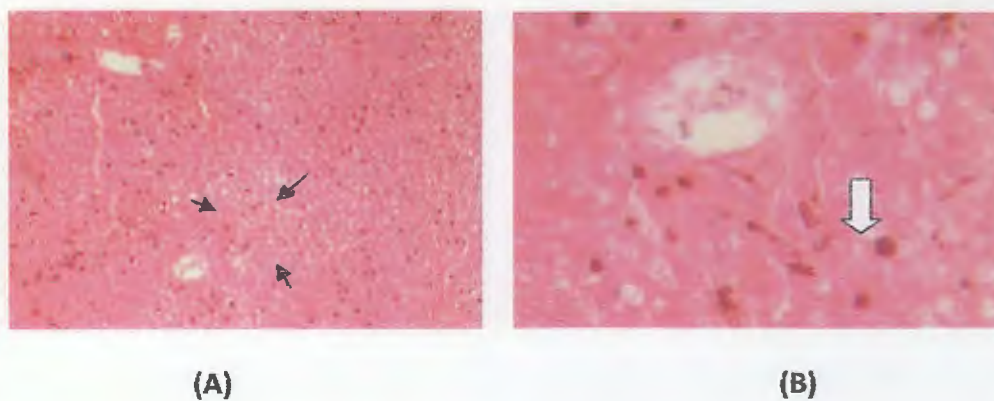


Figure 23 : Micrographie de l'examen histopathologique de coupes de foie colorées à hématoxyline/éosine de rats recevant une dose journalière de 100mg/kg de poudre de liège pendant 6j montrant en (A ; G x100) une vue d'ensemble du parenchyme hépatique avec une stéatose péricentrolobulaire (flèches noires) et en (B ; G x 400) la présence de certains noyaux pycnotique (Flèche blanche).

Discussion

Les métaux lourds sont de redoutables polluants de l'environnement. De part leur bioaccumulation et leur bioamplification ils constituent de véritables dangers pour la santé humaine. En effet, en plus des perturbations biochimiques et métaboliques qu'ils provoquent, ils seraient capables de déclencher ou d'amplifier des processus de stress oxydatif cellulaires particulièrement au niveau du foie préjudiciables de pathologies lourdes comme le cancer, l'Alzheimer ou l'insuffisance rénale. Plusieurs travaux ont montré que ce processus serait renforcé par la présence de hauts niveaux de métaux lourds (Hadi, 2004) et qui serait responsable d'une intensification de l'activité d'une série d'enzymes, tels que la superoxyde-dismutase (SOD), la catalase (CAT) ainsi que la peroxydation des lipides (Stegeman *et al.*, 1992).

C'est dans cette optique que nous nous sommes intéressés, dans notre travail, à l'évaluation *in vivo* des effets délétères des métaux lourds sur le foie d'une part et des possibilités de remédiation par le recours à la poudre de liège pour chélater le plomb et le cadmium *in situ* et de contrecarrer le stress hépatique qu'ils peuvent ainsi engendrer d'autre part. Cependant, l'absence de travaux sur l'utilisation pharmacologique de la poudre de liège nous rend la discussion des résultats difficiles.

La coexposition des rats à une concentration quotidienne de 10mg/kg pendant 7 jours d'une mixture plomb – cadmium provoque une grave altération du statut redox des cellules hépatiques accompagnées dans la présente étude par une toxicité hépatique significative, mise en évidence histologiquement, par la présence de foyers inflammatoires et de nécroses cellulaires conjointement à une élévation des taux plasmatiques de TGP, TGO et PAL. Les résultats de notre étude confirment déséquilibre entre la génération de ROS et la production d'antioxydants au cours de l'utilisation de métaux lourds comme l'ont déjà signalé certains auteurs (Joris, 2005 ; Belli, 2010). On note une augmentation significative des concentrations cytosolique du MDA, une baisse du GSH hépatique total et un déséquilibre dans les systèmes de défenses antioxydantes comme en témoigne l'augmentation de l'activité enzymatique de la SOD et la diminution de celle de la CAT. Bien que les mécanismes biochimiques responsables de la toxicité du plomb et du cadmium ne sont pas encore entièrement connus, l'un des principaux concepts relatifs à cette toxicité serait attribué à leur capacité à générer des ROS (Joris, 2005). L'attaque par ces ROS des acides gras polyinsaturés des lipides qui sont leur cible privilégiée ou peroxydation lipidique (Favier, 2003) dernière provoque alors une augmentation croissante de la perméabilité des membranes induisant une altération irréversible du fonctionnement cellulaire.

III. Résultats et Discussion

pouvant aller jusqu'à la lyse complète de la cellule. Résultat, formation d'une grande quantité de malondialdéhyde (MDA) qui aurait une demi-vie plus longue que celle des radicaux libre et diffuse facilement (Weber *et al.*, 2003; Milane, 2004). Les résultats de notre étude montrant une production excessive du MDA enregistrée chez les rats traités par la mixture plomb-cadmium et qui est certainement une fraction importante de l'action prooxydante exercée par ces deux métaux seraient alors en parfaite corrélation avec ceux déjà publiés par Lopez *et al.*, 2006; Moreira *et al.*, 2001; Stohs et Baghi, 1995; Valco *et al.*, 2006 qui ont signalé le rôle du plomb et du cadmium dans la surproduction du MDA.

Aussi, l'activité des aminotransférases sériques est considérée depuis longtemps ; comme un indicateur majeur des pathologies hépatiques (Molander *et al.*, 1955), au cours desquelles se produit une altération des fonctions de transport et de la perméabilité membranaire, conduisant à la fuite de ces enzymes, en dehors des cellules hépatiques, c'est pour cela que la présence augmentée des TGP dans la circulation chez les rats traités par les métaux comparés à ceux non traités (témoins) indique un dommage sévère des membranes des tissus hépatique. Résultat confirmée histologiquement par des dégénérescences hépatocellulaires et nécroses accompagnées de foyers inflammatoires.

Ces deux métaux toxiques ont une affinité particulière pour les groupements SH du glutathion réduit (Nigam *et al.*, 1999), ce qui peut déséquilibrer la balance désulfure cellulaire. Cette déplétion du glutathion consécutive à l'administration de la mixture de plomb et de cadmium a, en effet, était constaté par plusieurs auteurs. Ainsi, dans une étude récente de Wang et Fowler, 2008, il a été montré une diminution significative du taux du GSH au niveau des cellules rénales des rats exposés à un mélange de métaux. Un autre aspect très important de la toxicité du plomb et du cadmium serait lié à l'altération des enzymes antioxydantes, objectivé par une augmentation dans l'activité de la SOD et une diminution dans celle de la CAT.

Il est alors admis dans ce chapitre que, lorsque l'équilibre entre les niveaux intracellulaires des pro-oxydant et des antioxydants est perturbé, les radicaux libres sont produits en excès accumulés dans la cellule qui devient devant un stress oxydant certains et pour se protéger des effets toxiques de ces radicaux, les cellules développent une variété de mécanismes de défense (Aust et Svingen, 1985) en particulier la superoxyde dismutase (SOD) et la catalase cytosoliques et mitochondriales pour assurer la première ligne de défense.

III. Résultats et Discussion

En effet, les SOD agissent par voie catalytique, un excès de production de l'anion superoxyde conduit à une augmentation de la concentration cellulaire en SOD (Silvestre, 2005). La liaison des cations métalliques aux enzymes pourrait également altérer leur activité, non seulement en inhibant, mais aussi en stimulant la fonction catalytique de l'enzyme. Plusieurs auteurs (Fowler *et al.*, 2004; Masso *et al.*, 2007) ont pu mettre en évidence une réponse similaire de la SOD face aux contaminants métalliques.

Néanmoins, des réponses très variables de la CAT ont été décrites chez les animaux exposés au plomb et au cadmium (Gurer et Ercan, 2000; Patra *et al.*, 2001) en fonction de la dose et la durée d'exposition. La CAT catalyse la réaction de détoxification du H₂O₂ par dismutation en eau et en oxygène et agit en synergie avec la SOD (Toppi et Gabbrielli, 1999). Toutefois, une production accrue du peroxyde d'hydrogène peut excéder les capacités antioxydantes de cette enzyme, se traduisant par une inhibition de leur activité (Atli *et al.*, 2006).

Concernant le produit utilisé dans notre étude comme antioxydant, en l'occurrence la poudre de liège à une dose journalière de 100mg/kg n'a révélé aucun changement significatif dans les fonctions hépatique et rénale après un traitement de 8 jours de la poudre de liège ce que explique sa bonne tolérance et son innocuité. En effet la poudre de liège servait à l'époque comme un laxatif. Ses effets pharmacologiques seraient liés à la présence de fibres végétales dans la poudre comme la subérine, la lignine et aussi les tannins. Ceci explique aussi peut être l'absence d'effets antioxydants notables lors de son l'administration comme traitement adjuvant en dose journalière pendant 6 jours en préventif et en curatif chez les rats traitée par la mixture plomb-cadmium. En effet, elle provoquerait une légère baisse non significative de la concentration plasmatique des TGP, TGO et PAL par rapport aux animaux non traités par la poudre de liège mais qui reste toujours supérieur à celles enregistrées chez les témoins sains.

Toutefois, nous avons constaté que ce traitement provoque une légère réduction du taux de MDA cytosolique et de l'activité enzymatique de la SOD avec augmentation du taux de GSH cytosolique et celle de l'activité de la catalase. C'est résultat très intéressant et peut expliquer les possibilités antioxydantes de cette poudre de liège même si son effet direct serait difficile à mettre en évidence à cause de son malabsorption intestinale. Aussi, in vitro la poudre ajoutée à une suspension mitochondriale en présence de plomb et de cadmium 4uM ne réduisant que partiellement le découplage des phosphorylations oxydatives induit de manière drastique les métaux seuls

Conclusion

En se basant sur les résultats montrant la forte capacité de la poudre de liège, un déchet de transformation du liège, à adsorber les métaux lourds dans des systèmes synthétiques d'eau chargées, nous nous sommes posé la question si on pourrait utiliser ce composé naturel pour chélater ces toxiques dans les cellules du foie et pour reverser le stress oxydatif cellulaire engendré par le plomb et le cadmium.

Les résultats de notre étude confirment la toxicité du plomb et du cadmium et leur contribution dans l'installation d'un stress cellulaire oxydatif objectivé par :

- * Une augmentation du taux du MDA cytosolique.
- * Une diminution du glutathion réduit (GSH).
- * Une forte perturbation des enzymes CAT et SOD.
- * Une perturbation des paramètres biochimiques et histologiques (augmentation des PAL et des TGP ainsi que l'apparition de nécroses sur coupes histologiques).

Parallèlement, notre étude nous a permis de vérifier la bonne tolérance et l'absence de toxicité de la poudre de liège quand elle est administrée seule à des animaux. Toutefois, cette poudre n'a pas montré un effet pharmacologique significatif ni dans les lots traités en mode préventif (6 jours de poudre avant l'administration du plomb et le cadmium 10 mg/kg) ni dans ceux traité en mode curatif (6 jours de poudre après l'administration des métaux) hormis une légère amélioration des paramètres du stress oxydatif.

Les résultats que nous avons obtenus sont forts intéressants, du fait que nous sommes les premiers à étudier la possibilité de valorisation d'un polluant de l'environnement à très forte valeur ajoutée du fait des grandes quantités produites. Certes, beaucoup reste à étudier en particulier la pharmacocinétique ou les mécanismes d'action de la poudre. Aussi, nous proposons le remplacement de la poudre de liège sous sa forme naturelle par du charbon actif (préparé à partir de cette même poudre) car elle pose d'énormes difficultés d'absorption c'est-à-dire en termes pharmacocinétiques. L'autre possibilité de contournement de ces difficultés serait son encapsulation dans des nanosphères ou dans des liposomes.

Références bibliographiques

- 1/ **Amadur M.O., Doull J., Klaassen C.D., 1996.** Lead. In: Casarrett and doull's toxicology, 5^e éd, New York, McGraw-hell.
- 2/ **Ando, M., Osawa, T., 1978.** Studies on the disposition of calcium in bones of rats after continuous oral administration of cadmium. *Toxic. Appl. Pharmac.* 46: 625-632.
- 3/ **Ariana M.A. Pintor, Catarina I.A. Ferreira, Joana C. Pereira, Patrícia Correia, Susana P. Silva, Vítor J.P. Vilar, Cidália M.S. Botelho, Rui A.R. Boaventura, 2012.** Use of cork powder and granules for the adsorption of pollutants: A review. *Water Research.* Volume 46, Issue 10; 3152–3166.
- 4/ **Armenta, M.M., Rios, C., 2007.** Cadmium neurotoxicity. *Env toxicol and pharmacol.* 350-358.
- 5/ **Arris Sihem, 2008.** Etude Expérimentale de l'Élimination des Polluants Organiques et Inorganiques par Adsorption sur des Sous Produits de Céréales. p.30.
- 6/ **Asensio, A., 1987a.** Structural studies of a hemicellulose b fraction from the cork of *Quercus suber*. *Carb Res*, 165: 134.
- 7/ **Asensio, A., Seoane, E., 1987b.** Polysaccharides from the cork of *quercus suber*, I. Holocellulose and cellulose. *J Nat Prod*, 50: 811-814.
- 8/ **Asensio, A., 1988.** Polysaccharides from the cork of *quercus suber*, II. Hemicellulose. *J Nat Prod*, 51: 488-491.
- 9/ **Atli.G.A. Alptekini.O.Tuke , S et Canli,M., 2006.** Response of catalase activity to Ag⁺, Cd²⁺, Cr⁶⁺.Cu²⁺ and Zn²⁺ in five tissues of freshwater fish *Oreochromis niloticus*.(*Comparative Biochemistry and Physiology*) Part C, 143:218-224.
- 10/ **Beachamp, C. et Fridovitch, I., 1971.** Assay of superoxide dismutase.(*Anal Bioche*),44:276.
- 11/ **Berthoin, K., 2000.** Etude de la toxicité hépatique de la cocaïne associée à de l'alcool. Thèse de doctorat, université de Joseph Fourier- Grenoble I. Vol : 211. PP 9-27.
- 12/ **Bento, M. F., Pereira, H., Cunha, M. Á., Moutinho, A. M. C., Klaas Jan van den, B.,Jaap, J. B., 1998.** Thermally assisted transmethylation gas chromatography-mass spectrometry of suberin components in cork from *Quercus suber* L. *Phytochem Anal*, 9: 75-87.
- 13/ **Belli N., Chebab S., Tekouk M., Leghouchi E et Lahouel M., 2010.** Oxidative stress induced by the coexposition to lead and cadmium, two contaminants of the deep water of oued Nil (Jijel- Algeria). *Revue Science de l'Eau (RSE)*23(3), 289-301.
- 14/ **Bernards, M. A., 2002.** Demystifying suberin. *Canadian Journal of Botany*, 80: 227-240.
- 15/ **Bondy, S, GUO S., 1996.** Lead potentiates iron-induced formation of reactive oxygen species. *Toxicol Lett*, 87: 109 112.

- 16/ **Burnet, S., 1999.** Vue sur les mécanismes de contrôle hépatique suite au stress peroxydatif induit par le fer. Thèse de doctorat, université de Montréal. Vol : 176 :20-36.
- 17/ **Caldas, M. M., Ferreira, J. M. L., Borges, M. A., 1985.** About the chemical characterization of cork in the several stages of industrial processing. *Boletim do Instituto dos Produtos Florestais—Cortiça*, 560: 549-569.
- 18/ **Carvalho, J. S., 1968.** A química da cortiça. *Boletim da Junta Nacional da Cortiça*, 357: 3-11.
- 19/ **Chance, B. and Williams, G. R., 1955.** 'Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. III. The steady state', *J Biol Chem* 217(1): 409-27.
- 20/ **Christie NT, Costa M., 1984.** In vitro assessment of the toxicity of metal compounds. *Biol Trace Elem Res*, 6: 139-158.
- 21/ **Chubar Natália, Jorge R. Carvalho, M. Correia Joana Neiva. 2004.** Heavy metals biosorption on cork biomass: effect of the pre-treatment. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* 238, 51–58. [www.elsevier.com/locate/colsurfa].
- 22/ **C.I.R.E.I (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. Tom 2. P.175.
- 23/ **Clairborne, A., 1985.** Catalase activity. Cité par CRC Hand bouk of CRC press, Boca Raton. PP : 283-284.
- 24/ **Conde, E., Cadahía, E., García-Vallejo, M. C., Fernandez de Simon, B., Gonzalez Adrados, J.R., 1997.** Low molecular weight polyphenols in cork of *Quercus suber*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45: 2695-2700.
- 25/ **Conde, E., Cadahía, E., García-Vallejo, M. C., Fernandez de Simon, B., 1998.** Polyphenoli composition of *Quercus suber* cork from different spanish provenances. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46: 3166-3171.
- 26/ **Conde, E., García-Vallejo, M. C., Cadahía, E. 1999.** Waxes composition of reproduction cork from *Quercus suber* and its variability throughout the industrial processing. *Wood Science and Technology*, 33: 229-244.
- 27/ **Cordeiro, N., Belgacem, M. N., Silvestre, A. J. D., Pascoal Neto, C., Gandini, A. , 1998a.** Cork suberin as a new source of chemicals. 1. Isolation and chemical characterization of its composition. *International Journal of Biological Macromolecules*, 22: 71-80.
- 28/ **Cordeiro, N., Neto, C. P., Rocha, J., Belgacem, M. N., Gandini, A., 2002.** The organosolv fractionation of cork components. *Holzforschung*, 56: 135-142.

- 29/ **Da Ponte-E-Sousa, J. C. A. de C. C., Neto-Vaz, A., 2009.** Cork and metals: A review. *Wood Science and Technology*.
- 30/ **Décloître, F., 1998.** La part des différents aliments dans l'exposition au plomb, au cadmium et au mercure, en France. *Cahier de nutrition et de diététique*. Vol 33 (3) : 167-175.
- 31/ **Ding Y, Vaziri ND, Gonick HC., 1998.** Lead-induced hypertension II. Response to sequential infusions of L-arginine, superoxide dismutase and nitroprusside. *Environ Res*, 76: 107-113.
- 32/ **Dominguez MC, Sole E. Goni C, Ballabriga A., 1995.** Effect of aluminum and lead salts on lipid peroxidation and cell survival in human skin fibroblasts. *Biol Trace Elem Res*, 47: 57-67.
- 33/ **Ellman, G., 1959.** Plasma antioxydants. *Arch Biochem Biophys*, 82 :70-77.
- 34/ **Fassett, D. W., 1975.** Cadmium: biological effects and occurrence in the environment. *Annual review of pharmacology* 15, 425-35.
- 35/ **Fowler, B.A. Whittaker, M.H. Wang, G. et Chen, X.W., 2004.** Oxidative stress induced by lead, cadmium and arsenic mixtures:30-day, 90- day, and drinking water studies in rats: an overview.(*Biometals*),17(5):567-568.
- 36/ **Gibson, L. J., Easterling, K. E., Ashby, M. F., 1981.** The structure and mechanics of cork. *Proceeding of the Royal Society of London A*, 377: 99-117.
- 37/ **Gil, A. M., Lopes, M. H., Pascoal Neto, C., Callaghan, P. T., 2000.** An NMR microscopy study of water absorption in cork. *Journal of Materials Science*, 35: 1891-1900.
- 38/ **Gil, L., 1997.** Cork powder waste: An overview. *Biomass and Bioenergy*, 13: 59-61.
- 39/ **Gil, L., 1998A.** Cortiça: Produção, tecnologia e aplicação. INETI, Lisboa.
- 40/ **Gil, L., Moiteiro, C., 2002.** Cork. Dans : *Ullmann encyclopedia of industrial chemistry*, Weinheim, Wiley-VCH, 9: 503-522.
- 41/ **Graça, J., Pereira, H., 2000A.** Diglycerol alkenedioates in suberin: Building units of a poly(acylglycerol) polyester. *Biomacromolecules*, 1: 519-522.
- 42/ **Graça, J., Pereira, H., 2000B.** Methanolysis of bark suberins: Analysis of glycerol and acid monomers. *Phytochemical Analysis*, 11: 45-51.
- 43/ **Graça, J., Santos, S., 2006a.** Linear aliphatic dimeric esters from cork suberin. *Biomacromolecules*, 7: 2003-2010.
- 44/ **Graça, J., Santos, S., 2006 b.** Glycerol-derived ester oligomers from cork suberin. *Chemistry and Physics of Lipids*, 144: 96-107.

- 45/ **Gurer H. Ozgunes H. Neal R. Spitz Dr, Ercal N., 1998.** Antioxidant effects of N acetylcysteine and succimer i n red blood cells from lead-exposed rats. *Toxicology*, 128: 181-189.
- 46/ **Gurer H. et N. Ercan, 2000.** Can antioxidants be beneficial in the treatment of lead poisoning. *Free Radic. Biol. Med.* , 29, 927-45.
- 47/ **Hadi, M., 2004.** La quercetine et ses dérivées : Molécules à caractères pro oxydant ou capteur de radicaux libres, études et applications thérapeutiques. Thèse de doctorat, univ de Louis Pasteur Strasbourg I. 268p.
- 48/ **He, Z. L., Yang, X. E., and Stoffella, P. J., 2005.** Trace elements in agroecosystems and impacts on the environment. *J Trace Elem Med Biol* 19, 125-40.
- 49/ **Hsu Pc, Liu My, Hsu Cc, Chen Ly, Leon Guo Y., 1997.** Lead exposure causes generation of reactive oxygen species and functional impairment in rat sperm. *Toxicology*, 122: 133-143.
- 50/ **Holloway, P. J., 1972.** The composition of suberin from the corks of *Quercus suber* L. and *Betula pendula* roth. *Chemistry and Physics of Lipids*, 9: 158-170.
- 51/ **Iarc. 1980.** Monographs on the evaluation of carcinogenic risks of chemicals to humans. Some metals and metallic compounds. Lyon, centre international de recherche sur le cancer, vol.23, pp. 325-415.
- 52/ **Igbal, M.Som, D.Syasumasa, O. Masayoshi, F et Shigero, O., 2003.,**Dietary supplementation of curcumin en hances antioxidant and phase II metabolising enzymes in ddy mal mice : Possible role in protection against chemical carcinogenesis and toxicocity. (*Pharmacology and toxicology*),92:33-38.
- 53/ **International Food Information Council. 2008** Fiber Fact Sheet. [www.ifi c.org].
- 54/ **Itokawa, Y., Tomoko, A., Tabei, R., 1974.** Renal and skeletal lesions in experimental cadmium poisoning. *Arch. Environ. Health.* 28:149-154.
- 55/ **Jarup, L., 2003.** Hazards of heavy metal contamination. *British medical bulletin* 68, 167-82. Jeggo, P. A. (1998). Identification of genes involved in repair of DNA double-strand breaks in mammalian cells. *Radiation research* 150, S80-9.
- 56/ **Joris, M.A., 2005.** Etudes biochimiques et génétiques de la réponse adaptative de mollusques face aux contaminations métalliques et au stress oxydant. Thèse de doctorat, univ de Bordeaux I. 265p.
- 57/ **Kasprzak K K.S; Hoover K.L; Poirier L.A., 1985.** Effect of distary cakium acetate on lead subacetate carcinogenicity in kidneys of male Sprague- Dawley rats. *Carcinogenesis*; 6, 2, pp. 279-282.
- 58/ **Kim, Y.K., Choi, J.K., Park, Y.S., 1988.** Changes in renal function in cadmium intoxicated rats. *Pharmacology & toxicology.* 63: 342-350.

- 59/ Kolattukudy, P. E., 1980. Biopolyester membranes of plants: Cutin and suberin. *Science*, 208: 990-1000.
- 60/ Fouad Krika, Noureddine Azzouz , Mohamed Chaker Ncibi, 2012. Adsorptive removal of cadmium from aqueous solution by cork biomass: Equilibrium, dynamic and thermodynamic studies. *Arabian Journal of Chemistry*. [www.sciencedirect.com].
- 61/ Kudzin, S. F., Debaun, R. M., Nord, F. F., 1951. Investigations on lignin and lignification.VI. The comparative evaluation of native lignins. *Journal of The American Chemical Society*, 73: 4615-4618.
- 62/ Lahsissene H., Kahouadji A., Tijane M. & Hseini S. Décembre 2009. « Catalogue des plantes medicinales utilisees dans la region de zaër (maroc occidental) », *Lejeunia*, N=°186. [<http://www.scribd.com/doc/57709703/Lejeunia-186-2>].
- 63/ Lapreche, V., Dictor, M.C., Clozel, B., Baranger, P., 2004. Guide méthodologique du plomb appliqué à la gestion des sites et des sols pollués : Rapport final. BRGM/RP. 138pp.
- 64/ Laurewys R.R., 1983 -Biological monitoring of exposure to inorganic and organometallic substances. Lead. *Industrial Chemical Guidelines for Biological Monitoring*. Davis, Biomedical Publ. pp. 27-38.
- 65/ Lopes, M. H., Gil, A. M., Silvestre, A. J. D., Neto, C. P., 2000a. Composition Of suberin extracted upon gradual alkaline methanolysis of *Quercus suber* L. Cork. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 383-391.
- 66/ Lopes, M. H., Neto, C. P., Barros, A. S., Rutledge, D., Delgadillo, I., Gil, A. M., 2000b. Quantitation of aliphatic suberin in *Quercus suber* L. Cork by FTIR spectroscopy and solid-state ¹³C-NMR spectroscopy. *Biopolymers*, 57: 344-351.
- 67/ Lopes, M. H., Sarychev, A., Pascoal Neto, C., Gil, A. M. 2000c. Spectral editing of ¹³C CP/MAS NMR spectra of complex systems: Application to the structural.
- 68/ Lopez, E. AACE, C.M.J.Oset- Gasque, M.J.Canadas,S et 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.
- 69/ Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A., Randall, R., 1951. Proein measurmnt with the folin phenol reagent. *Journal of Biological chemistry*. 193: 265-275.
- 70/ Marques, A. V., Pereira, H., Meier, D., Faix, O., 1994. Quantitative analysis of cork (*Quercus suber* L.) and milled cork lignin by FTIR spectroscopy, analytical pyrolysis, and total hydrolysis. *Holzforschung*, 48: 43-50.
- 71/ Masso E.L., L. Corredor et M.T. Antonio, 2007. Oxidative damage in liver after perinatal intoxication with lead and/or cadmium. *J. Trace Elem. Med. Biol.*, 21, 210-216.

- 72/ **Messaoudi, I., Ben chaoucha, C., 2002.** Fixation du cadmium par différents tissus et ses effets sur le poids corporel et la calcémie chez un rongeur Gerbillidé. *Mérione Shawi Shawi. Mammalia*. 60(4): 553-562.
- 73/ **Miquel, G., 2001.** Rapport sur : « Les effets des métaux lourds sur l'environnement et la santé ». Office parlementaire d'évaluation des choix scientifiques et techniques. Vol 365p.
- 74/ **Moire, L., Schmutz, A., Buchala, A., Yan, B., Stark, R. E., Ryser, U., 1999.** Glycerol is asuberin monomer. New experimental evidence for an old hypothesis. *Plant Physiology*, 119: 1137-1146.
- 75/ **Molander, D.W., Wroblewsk F., LA Due J.S., 1955.** Transaminase compared with cholinesterase and alkaline phosphatase an index of hepatocellular integrity. *Clin. Res Proc.*;3:20-24.
- 76/ **Moreira, G.E., G.I. Rosa, S.B. Barros, V.C. Vassileiff et I. Vassileff. 2001.** Antioxidant defence in rat brain regions after developmental lead exposure. *Toxicol.* , 169, 145-51.
- 77/ **Natividade J., 1956.** Subériculture, édition française de l'ouvrage portugais «Subéricultura », ENEF (Nancy), 103p.
- 78/ **Natividade, J. V., 1990.** Subericultura. Ministério da Agricultura, Pescas e Alimentação, Lisbon.
- 79/ **Nigam D., G.S. Shukla ET A.K. Agarwal. 1999.** Glutathione depletion and oxidative damage in mitochondria following exposure to cadmium in rat liver and kidney. *Toxicol. Lett.* , 106, 151-7.
- 80/ **Parameswaran, N., Liese, W., Günzerodt, H. 1981.** Caracteristicas do verde da cortiça de *Quercus suber. L.* Dans : *Anais do Instituto superior de Agronomia*, 40.
- 81/ **Patra R.C., D. Swarup et S.K. Dwivedi. 2001.** Antioxidant effects of a-tocopherol, ascorbic acid and L-methionine on lead induced oxidative stress to the liver, kidney and brain in rats. *Toxicol.* , 162, 81-8.
- 82/ **Pereira, H., 1988.** Chemical composition and variability of cork from *Quercus suber L.* *Wood Science and Technology*, 22: 211-218.
- 83/ **Perra, B., Haluk, J.-P., Metche, M., 1995.** IR, 1H and 13C NMR spectroscopic studies of suberin from beech bark (*Fagus sylvatica L.*). *Holzforschung*, 49: 99-103.
- 84/ **Pillet, S., 2001.** Evaluation du risque immuotoxicologique lié à l'exposition au cadmium chez les phoques gris. Thèse de doctorat, univ de Liège. 334p.
- 85/ **Pillier, F., 2002.** Biotex : guide biotoxicologique pour les médecins du travail. INRS. Paris 202p.

- 86/ **Pichard, A., 2005.** Cadmium et ses dérivés. Fiches de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques. ERIS- DRC. 102p.
- 87/ **Plante, R., Benedetti, J.L., 1998.** Définition d'une maladie à déclaration obligatoire ou d'une intoxication et d'une exposition significative : le plomb. Direction des risques biologiques, environnementaux et occupationnels. 62p.
- 88/ **Rocha, S. M., Coimbra, M. A., Delgadillo, I., 2000.** Demonstration of pectic polysaccharides in cork cell wall from *Quercus suber* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 2003-2007.
- 89/ **Rustin, P., 1994.** Biochemical and biomolecular investigation in the respiratory chain deficiencies. *Clin Chim Acta*. 288 : 35-51.
- 90/ **Sandhir R. Gill KD., 1995.** Effect of lead on lipid peroxidation in liver of rats. *Biol Trace Element Res*, 48: 91-97.
- 91/ **Santos, S., Graça, J., 2006.** Glycerol-w-hydroxyacid-ferulic acid oligomers in cork suberin structure. *Holzforschung*, 60: 171-177.
- 92/ **Santos Sónia A.O., Paula C.R.O. Pinto, Armando J.D. Silvestre, Carlos Pascoal Neto, 2010.** Chemical composition and antioxidant activity of phenolic extracts of cork from *Quercus suber* L. *Industrial Crops and Products*. [www.elsevier.com/locate/indcrop].
- 93/ **Shafiq UR-rehman S. Chandra O, Abdulla M., 1995.** Evaluation of malondialdehyde as an index of lead damage in rat brain homogenates. *Biometals*, 8: 275-279.
- 94/ **Schubert, W. J., Passannante, A., Stevens, G. d., Bier, M., Nord, F. F., 1953.** Investigations on lignin and lignification. XIII. Electrophoresis of native and enzymatically liberated lignins. *Journal of The American Chemical Society*, 75: 1869-1873.
- 95/ **Silva, S. P., Sabino, M. A., Fernandes, E. M., Correlo, V. M., Boesel, L. F., Reis, R. L., 2005.** Cork: Properties, capabilities and applications. *International Materials Reviews*, 50: 345-365.
- 96/ **Silvestre F., 2005.** Réponse à un stress environnemental induit par le cadmium chez un crustacé euryhalin : *Ericheir sinensis*. Approche intégrative incluant une analyse de protéine. Thèse de doctorat, Univ. Notre-Dame de la Paix, France, 72 p.
- 97/ **Skoczynska A., 1997.** Lipid peroxidation as a toxic mode of action for lead and cadmium. *Med Pr*, 48: 197-203.
- 98/ **Soares, M. E., Lourdes Bastos, M., Ferreira, M. A., 1993.** Determiration of copper, iron, aluminium, lead and cadmium in cork stoppers by electrothermal atomic absorption spectrometry. *Journal of analytical atomic spectrometry*, 8: 655-657.

- 99/ Stegeman, J.J., Brouwer, M., Digiulio, R.T., Forlin, L., Fowler, B.H., Sanders, B.B., Vanheld, P.A., 1992. Molecular and protein systems as indicators of chemical exposure and effect. Editors : Michigan, USA; Louis Publishers.
- 100/ Stohs S.J. ET D. Baghi. 1995. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic. Biol. Med.* , 18, 21-36.
- 101/ Tierra Toxic., 2002. Terrorisme chimique ;Revue de toxicologie. Lyon. France. (4); 28p.
- 102/ Toppi, D.S., Gabrieli, R., 1999. Response to cadmium in heigher plants. *Enviromental and Experimental Batony.* 41 : 105-130.
- 103/ Trinchella, F., Riggio, M., Filosa, S., Volpe, M. G., Parisi, E., and Scudiero, R., 2006. Cadmium distribution and metallothionein expression in lizard tissues following acute and chronic cadmium intoxication. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 144, 272-8.
- 104/ Valco, M., Pihodes, J.C., Moncol, J., Izatovic, M., Mazur, M., 2002. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress induces cancer. *Chemico-Biological Interactions.* 1601-40.
- 105/ Vane, C. H., Drage, T. C., Snape, C. E., 2006. Bark decay by the white-rot fungus *Lentinula edodes*: Polysaccharide loss, lignin resistance and the unmasking of suberin. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 57: 14-23.
- 106/ Vaziri Nd, Ding Y, NL Z. Gonick Hc., 1997. Altered nitric oxide and increased oxygen free radical activity in lead induced hypertension: effect of lazaroid therapy. *Kidney Intern*, 52: 1042-1046.
- 107/ Wang G. et Fowler B.A. 2008. Roles of biomarkers in evaluating interactions among mixtures of lead, cadmium and arsenic. *Toxicol. Appl. Pharmac.*, 233, 92-99.
- 108/ Waisberg, M., Joseph, P., Hale, B., and Beyersmann, D., 2003. Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis. *Toxicology* 192, 95-117.
- 109/ Watanabe, M., Henmi, K., Ogawa, K., Suzuki, T., 2003. Cadmium dependant generation of reactive oxygen speis and mitochondrial DNA breks in photosynthetic and photosynthetic strain of *Euglema gracilis*. *Camp Biochem Physiol. C-toxicol Pharmacol.*134/ 2276234.
- 110/ Watjen, W., Beyersmann, D., 2004. Cadmium-induced apoptosis in C6 glioma cells: influence of oxidative stress. *Biometals* 17, 65-78.
- 111/ Weber L.W.D., Bull M., Stamp A., 2003. Hepatotoxicity and mechanism of action haloalkanes: carbon tetrachloride as a toxicological model. *Crit. Rev. Toxicol.*;33:105-136.
- 112/ Xu M, Moratalla R. Gold Lh, Hirol N. Koob Gf et coll., 1994. Dopamine receptor mutant mice are deficient in striatal expression of dynorphin and in dopamine-mediated behavioral responses. *Cell* 1994, 79: 729-742.

Références bibliographiques

113/ **Yiin S), Lin Th., 1995.** Lead-catalyzed peroxidation of essential unsaturated fatty acid. Biol Trace Element Res, 50: 167-172.

الملخص

الرصاص والكاديوم من بين أكثر الملوثات، يتوزعان على نطاق واسع في البيئة. بسبب ثباتهما العالي، فهما أكثر سمية وخطرا بالنسبة للبيئة و البشر. في هذا السياق، نقترح نهجنا في معالجة هذه المشاكل الصحية عن طريق استخدام مسحوق الفلين، وهو مادة طبيعية يمكن استخدامها في إزالة المعادن الثقيلة نظرا لقدرتها على الالتصاق.

ولهذا أعطيت جرعة 10 مغ/كغ لجرذان وستار لمدة اسبوع مع استعمال نمط علاجي و نمط وقائي بمسحوق الفلين 100 مغ/كغ لمدة اسبوع. تمثلت الدراسة في معايرة بيوكيميائية لأنزيمات الكبد متبوعة بتقييم الاجهاد التأكسدي الكبدية.

أثبتت الدراسة عدم سميت مسحوق الفلين، وكذلك تأثيرها النسبي على الاجهاد التأكسدي مما يدل على أهميتها الممكنة في الميدان الصيدلاني.

كلمات البحث: مسحوق الفلين، المعادن الثقيلة، التسمم، المعالجة، التقييم.

Résumé

Le plomb et le cadmium sont parmi les polluants les plus largement distribués dans l'environnement. À cause de leur forte persistance, ils font partie des toxiques les plus puissants et les plus dangereux aussi bien pour l'environnement que pour l'homme. Dans ce contexte, nous proposons notre approche de remédiation à ces problèmes de santé par le recours à la poudre de liège qui est un matériau naturel pouvant être utilisée dans l'élimination des métaux lourds grâce à sa capacité de complexation.

Pour cela des rats Wistar ont été traités par l'association du plomb et du cadmium (10 mg/kg) pendant une semaine, puis traités par la poudre de liège en curatif (100mg/kg) par gavage gastrique pendant une semaine d'autre animaux ont reçu un traitement préventif. Des dosages biochimiques des paramètres hépatiques ont été effectués dans le sang. Parallèlement, nous avons procédé à l'évaluation du stress oxydatif dans les différents groupes d'animaux.

Notre étude nous a permis de vérifier la bonne tolérance et l'absence de toxicité de la poudre de liège quand elle est administrée seule à des animaux. Toutefois, cette poudre n'a pas montré un effet pharmacologique significatif ni dans les lots traités en mode préventif ni dans ceux traité en mode curatif hormis une légère amélioration des paramètres du stress oxydatif.

Mots clés: Poudre de liège- Métaux lourds- Intoxications- traitement- Valorisation.

Abstract

Lead and cadmium are among the most widely distributed pollutants in the environment. Because of their high persistence, they are among the most potent toxic and dangerous both for the environment than to humans. In this context, we propose our approach to remediation of these health problems by the use of powdered cork is a natural material that can be used in removing heavy metals due to its complexing capacity.

For this, Wistar rats were treated with the combination of lead and cadmium (10 mg / kg) for one week and then treated with cork powder in healing (100mg/kg) by gastric gavage for one week to other animals were given preventive treatment. Biochemical assays of liver function tests were performed in the blood. In parallel, we evaluated oxidative stress in various animal groups.

Our study allowed us to verify the good tolerance and lack of toxicity of the cork powder when administered alone to animals. However, the powder did not show a significant pharmacological effect or in treated groups in preventive mode or in those treated with curative mode except for a slight improvement in oxidative stress parameters.

Key words: Powder with cork-Heavy metals-Intoxications-Treatment-Valuation.