

*République Algérienne Démocratique et Populaire*  
*الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية*  
*Ministère de l'enseignement Supérieur*  
*et de la Recherche Scientifique*  
*وزارة التعليم العالي و البحث العلمي*  
*Université de JIJEL*



*Faculté des Sciences Exactes et Sciences de la Nature et de la Vie*  
*Département de Biologie Moléculaire et Cellulaire*

*Mémoire de Fin d'Etudes en vue de l'Obtention du Diplôme*  
*des Etudes Supérieures*

*Option : BIOCHIMIE*

*Thème*

*Effet neurotoxique de l'endosulfan et la*  
*prévention de cette toxicité par l'extrait des*  
*poly phénols.*

*Membres de jury :*

*\* Examineur : Laib Essaid*

*\* Encadreur : Kebieche Mohammed*

*Réalisé par :*

*\*Gouder Leila*

*\*Boultiour Wafa*



*Promotion 2009*



## Remerciement

*Nous tenons à remercier tout d'abord Allah le tout puissant et maître de l'univers qui nous a donné la capacité nécessaire, la forte volonté et la patience afin d'accomplir ce travail et qui nous a toujours guidé vers le bon chemin.*

*Puis, nous tenons à coeur à exprimer notre profonde gratitude à notre encadreur Mr KEBIECHE MOHAMED qui nous a suivis tout au long de ce travail et à la remercier infiniment pour ses conseils avisés, pour sa disponibilité continuelle et pour son encadrement déterminé.*

*Merci de nous partager vos connaissances avec tant d'enthousiasme, de patience et de gentillesse.*

*Nous remercions vivement notre examinateur Mr LAIB ESSAID d'avoir accepté de faire partie de notre jury et qui a sacrifié de son temps afin d'examiner et d'évaluer ce travail. Nous lui témoignons toutes nos reconnaissances.*

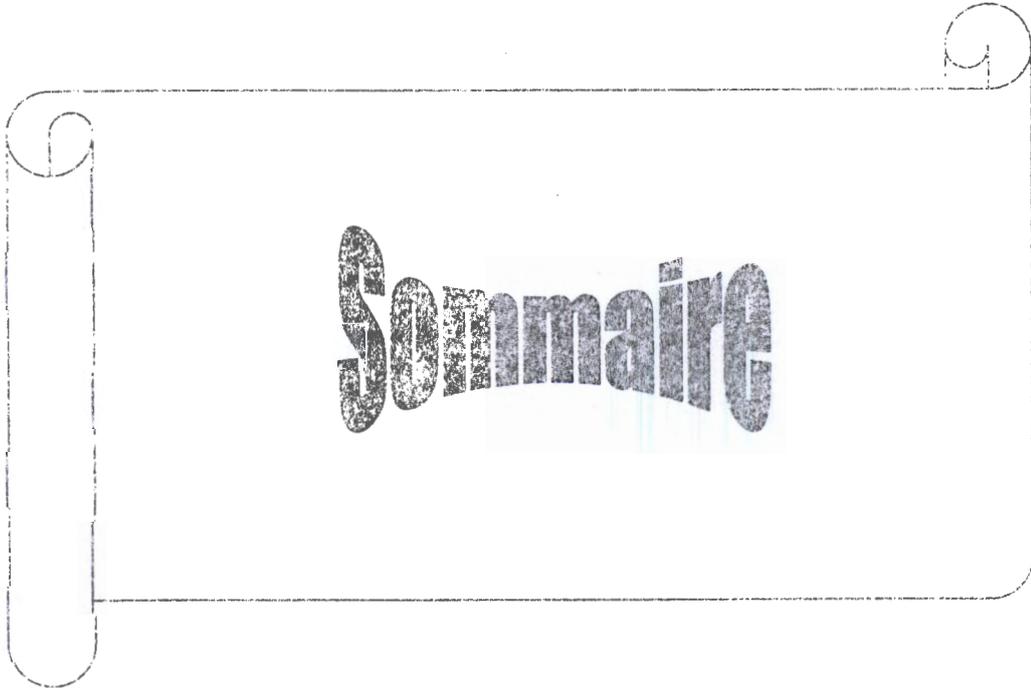
*Notre remerciement s'adresse également au :*  
*Toutes l'équipe du laboratoire de l'institut de biologie*  
*L'enseignante M<sup>lle</sup> Keba Widad*  
*L'enseignant Mr Boudjarda*  
*Docteur Lahouel Mesbahi*

*Et à tout les enseignants en particuliers ceux qui nous ont transmis leur savoir durant les quatre ans.*

*Nous ne serions bien sûr jamais arrivée là sans l'aide et le soutien de nos familles, nos collègues et nos amis. Merci à nos parents pour avoir toujours cru en nous, merci de nous avoir soutenue dans cette voie, merci de votre présence, de vos encouragements, de vos conseils, de vos attentions constantes, merci pour tout j'espère vous rendre le bonheur que vous m'apportez.*

*Leïla*

*Wafa*

A decorative border resembling a scroll, with a vertical line on the left and a horizontal line on the top and right, all ending in elegant scrollwork.

# Sommaire

# SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	1
-------------------	---

## PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

### CHAPITRE 1 : Généralités sur les pesticides et l'endosulfan

1.1. Les pesticides.....	2
1.1.1. Définition et historique .....	2
1.1.2. Classification .....	3
1.1.3. Utilisation des pesticides.....	4
1.1.4. Mode d'action des pesticides .....	5
1.1.5. La toxicité des pesticides .....	5
1.2. L'endosulfan.....	6
1.2.1. Définition.....	6
1.2.2. Structure .....	6
1.2.3. Mode d'action.....	7
1.2.4. Propriétés physico-chimique .....	7
1.2.5. Production et utilisation .....	7
1.2.6. Consommation.....	8
1.2.7. Devenir de l'endosulfan .....	8
1.2.8. Toxicité .....	9

### CHAPITRE 2 : le système nerveux et le stress oxydant

2.1. Le système nerveux .....	11
2.1.1. Définition .....	11
2.1.2. Organisation et classification du système nerveux.....	11
2.1.3. Anatomie du système nerveux .....	11
2.1.4. Les principales fonctions du système nerveux .....	14
2.1.5. La neurotoxicité.....	14
2.2. Le stress oxydant.....	15
2.2.1. Définitions .....	15
2.2.2. Les espèces réactives de l'oxygène et leur origine.....	16
2.2.3. Rôle pathologique des espèces actives de l'oxygène.....	22
2.2.4. Les systèmes de contrôle des radicaux libres par la cellule.....	26

## PARTIE PRATIQUE

### CHAPITRE 3 : Matériel et méthodes

3.1. Matériel.....	38
3.2. Méthodes.....	38
3.2.1. Extraction des poly phénols .....	38
3.2.2. Traitement des animaux.....	39
3.2.3. Sacrifice et prélèvement du cerveau.....	39
3.2.4. Préparation de la fraction cytosolique .....	39
3.2.5. Dosage du MDA, GSH, SOD, CAT et protéines.....	40

<b>CHAPITRE 4 : Résultat et interprétation</b>	
4.1. L'évaluation globale du statut redox des cellules nerveuses .....	46
4.2. Evaluation de la peroxydation lipidique .....	46
4.3. Evaluation du taux du GSH.....	47
4.4. Evaluation de l'activité de la SOD .....	48
4.5. Evaluation de l'activité de la CAT .....	49
4.6. Evaluation de la teneur cytosolique en protéines .....	50
<b>CHAPITRE 5 : Discussion</b> .....	<b>52</b>
<b>Conclusion</b> .....	<b>55</b>

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1:</b> Historique de l'évolution des trois grandes familles des pesticides d'activité de l'année 1900 à nos jours.....	2
<b>Tableau 2 :</b> Principaux radicaux libres et comparaison de leur pouvoir oxydant.....	17
<b>Tableau 3 :</b> Les propriétés bioactives des poly phénols .....	34
<b>Tableau 4 :</b> Les étapes de la réalisation de dosage du MDA .....	41
<b>Tableau 5 :</b> les étapes de la réalisation de dosage du GSH.....	42
<b>Tableau 6 :</b> Les étapes de la réalisation de dosage du SOD .....	42
<b>Tableau 7 :</b> Etapes de la réalisation de dosage du CAT.....	43
<b>Tableau 8 :</b> Etapes de la réalisation de dosage des protéines .....	44
<b>Tableau 9 :</b> Variation des différents paramètres du statut redox des cellules nerveuses chez les différents groupes de rats .....	46

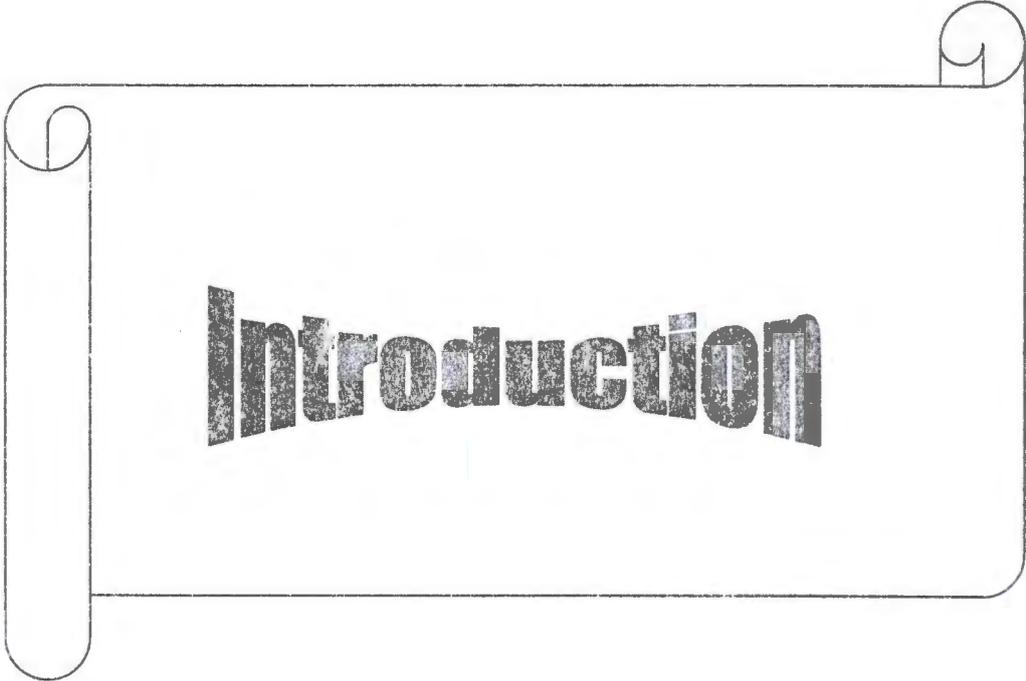
## Liste des figures

<b>Figure 1:</b> Les isomères de l'endosulfan .....	6
<b>Figure 2 :</b> Le mécanisme de la peroxydation lipidique.....	23
<b>Figure 3 :</b> Réactions en chaîne de la peroxydation lipidique et ses produits terminaux.....	24
<b>Figure 4 :</b> Illustration d'un mode d'action des radicaux hydroxyl (addition sur les doubles liaisons) avec une base de l'ADN, la guanine .....	25
<b>Figure 5 :</b> Nature de quelques modifications des chaînes latérales d'acides aminés des protéines après attaque radicalaire .....	26
<b>Figure 6 :</b> Antioxydants d'origine alimentaire : $\alpha$ -tocophérol, acide ascorbique $\beta$ -carotène, acide caféique et quercétine .....	30
<b>Figure 7 :</b> Structure d'un phénol simple.....	31
<b>Figure 8 :</b> La structure chimique des flavonoïdes.....	32
<b>Figure 9 :</b> Piégeage des ROS (R) par les flavonoïdes .....	36
<b>Figure 10 :</b> Flavonoïdes et leurs sites proposés pour la chélation des ions métalliques ( $Me^{n+}$ ).....	37
<b>Figure 11:</b> Eléments essentiels pour l'activité antioxydante des flavonoïdes .....	37
<b>Figure 12 :</b> Fruit <i>citrus sinensis</i> .....	38
<b>Figure 13 :</b> Réaction MDA avec TBA .....	40
<b>Figure 14 :</b> Réaction du GSH avec DTNB .....	41
<b>Figure 15:</b> Méthode d'administration par gavage gastrique .....	45
<b>Figure 16 :</b> Prélèvement du cerveau.....	45
<b>Figure 17 :</b> La variation de l'activité du MDA cytosolique des cellules nerveuses dans les différents groupes de rats .....	47
<b>Figure 18 :</b> La variation de l'activité de GSH cytosolique des cellules nerveuses dans les différents groupes de rats .....	48
<b>Figure 19 :</b> La variation de l'activité de la SOD cytosolique des cellules nerveuses dans les différents groupes de rats.....	49
<b>Figure 20 :</b> La variation de l'activité de la catalase cytosolique des cellules nerveuses dans les différents groupes de rats .....	50
<b>Figure 21 :</b> Variation de la teneur cytosolique en protéines des cellules nerveuses chez les différents groupes de rats .....	51

## Liste d'abréviation

- ADN:** Désoxy-nucléic acid.  
**ATP:** Adénoside triphosphate.  
**C:** Carbone.  
**CAT:** Catalase.  
**Cm :** Centimètre.  
**CoA:** Coenzyme A.  
**Cu<sup>++</sup>:** Cuivre.  
**Da:** Dalton.  
**DDT:** Dichloro-Diphénil-Trichloréthane.  
**DHHP:** Déhydrohétérohexahydroxydiphénique (acide chébulique).  
**DL<sub>50</sub> :** Dose létale 50.  
**DO:** Densité optique.  
**DT<sub>50</sub>:** Dose toxique 50.  
**DTNB:** 5, 5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid).  
**EDTA:** Ethylène Diamine Tetra Aetic.  
**g:** Gramme.  
**GABA:** Acide 4- amino butanoïque.  
**GPx:** Glutathion peroxydase.  
**GSH:** Glutathion.  
**H:** Hydrogène.  
**H<sub>2</sub>O:** Eau.  
**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** Peroxyde d'hydrogène (Eau oxygéné).  
**HETE:** Hydroxyeicosatétraénoïque.  
**HHDP:** Hétérohexahydroxydiphénique.  
**HPETE:** Hydroperoxyeicosatétraénoïque.  
**K:** Potassium.  
**KCl:** Chlorure de potassium.  
**Kg:** Kilogramme.  
**KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> :** Phosphate dipotassique.  
**l:** Litre.  
**LCR:** Liquide céphalo-rachidien.  
**LDL:** Low densité lipoprotein.  
**Log:** Logarithme.  
**M:** Molaire.  
**MDA:** Malonedialdehyde.  
**mg:** Milligramme.  
**min:** Minute.  
**ml:** Millilitre.  
**mM:** Millimolaire.  
**NaCl:** Chlorure de sodium.  
**NADPH:** Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit.  
**NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>:** Phosphate dissodique.  
**NBT:** Nitroblutetrazolium.  
**NDD:** Neuro developmental disorders.

**nM:** Nano-mole.  
**O:** Oxygène.  
**OH:** Hydroxyle.  
**OMS:** Organisation mondiale de la santé.  
**PCB:** Diphenyl polychlorés.  
**pH:** Point isoélectrique.  
**PPS:** Produit phyto sanitaire.  
**ROS:** Espèce réactive d'oxygène.  
**SNA:** Système nerveux autonome.  
**SNC:** Système nerveux central.  
**SNP:** Système nerveux périphérique.  
**SOD:** Superoxyde dismutase.  
**TBA:** Acide thiobarbiturique.  
**TBARS:** Substance réagissent avec l'acide thiobarbiturique.  
**TCA:** Trichloracétique.  
**TEP:** Tetraetoxypropane.  
**THDA:** Troubles d'hyperactivité avec déficit de l'attention.  
**TNB:** Thionitrobenzoïque.  
**tpm:** Tour par minute.  
**UI:** Unité international.  
**UV:** Ultra violet.  
**W:** Watt.  
**Zn<sup>++</sup>:** Zinc.  
**%:** Pourcentage.  
**°C:** Degrée Celsius.  
**µl:** Micro-litre.



# Introduction

## Introduction

L'homme est souvent exposé à de nombreuses substances naturelles ou artificielles. Dans certaines conditions, ces expositions peuvent être la cause d'effets néfastes sur la santé des êtres humains, allant de perturbations biologiques minimales jusqu'à la mort. La nature et l'intensité des effets d'un produit chimique sur l'organisme dépendent de sa concentration dans les organes cibles, elle-même fonction de la dose administrée, mais aussi d'autres facteurs tels que l'absorption, la distribution, la capacité de fixation et l'excrétion.

Les produits chimiques peuvent pénétrer dans l'organisme par la nourriture, comme les mycotoxines et d'autres contaminants ou par la peau. Cette dernière voie concerne les pesticides (Frank, 1991).

Les pesticides sont des substances minérales ou organiques de synthèse utilisées à vaste échelle contre les ravageurs de culture. Ils sont également destinés à lutter contre les animaux nuisibles et les agents vecteurs d'affections parasitaires ou microbiologiques de l'homme et des animaux domestiques (Ramade, 1993). Les insecticides organochlorés (Endosulfan) stimulent le système nerveux et induisent une paresthésie, une sensibilité à la stimulation, une irritabilité, un équilibre perturbé, des tremblements et des convulsions. Le mode d'action précis n'est pas connu ; cependant, certains de ces produits induisent une facilitation et une hyper-excitation aux jonctions synaptiques et neuromusculaires, cause de décharges répétitives dans les neurones centraux, moteurs et sensoriels. Le système nerveux, structure vitale de l'organisme est protégé des toxiques présents dans le sang par des systèmes uniques de protection, une barrière hémato-encéphalique et une barrière nerveuse périphérique. Pourtant le système nerveux est sensible à de nombreux toxiques (Frank, 1991).

Depuis les temps, les plus reculés, l'homme a utilisé des plantes, d'abord pour se nourrir, puis pour se soigner. Au cours du temps, d'autres constatations ont permis de sélectionner des plantes pour soigner des maladies et d'autres plantes pour soigner d'autres maladies. Jusqu'au début du XX<sup>ème</sup> siècle, presque tous les médicaments étaient d'origine végétale. Les plantes sont extrêmement complexes du point de vue de leur composition chimique. On estime qu'elles sont formées de plusieurs milliers de constituants différents, dont quelques uns seulement sont responsables de l'effet thérapeutique ou de l'effet toxique (Hostettmann et *al.*, 1998).

Les composés phénoliques sont largement présents dans le règne végétal. Parmi eux, les flavonoides et les isoflavonoides et forment une catégorie importante, aux propriétés multiples. Ces issus du métabolisme secondaire, font l'objet de nombreuses recherches orientées en particulier sur la connaissance de leurs structures chimiques et leurs propriétés thérapeutiques (Stanley et *al.*, 2004).

Dans cette étude la stratégie de recherche adoptée est d'administrer l'endosulfan aux animaux à la dose de 4 mg/g, concentration retrouvée dans les légumes cultivés dans la région de Jijel, et ensuite d'investir la portée de la toxicité neuronale de cet organochloré largement utilisé par les agriculteurs, dans la lutte contre les parasites nuisibles aux légumes et fruits.

Une évaluation de l'effet préventif des extraits polyphénoliques des épluches d'orange, sera réalisée en parallèle pour essayer de prévenir la neurotoxicité des animaux par l'endosulfan.



**Partie bibliographique**

# Chapitre 1

Généralités sur les pesticides  
et l'endosulfan

### 1.1.2. Classification

Les pesticides disponibles aujourd'hui sur le marché sont caractérisés par une telle variété de structure chimique, de groupes fonctionnels et d'activité que leur classification est complexe. D'une manière générale, ils peuvent être classés en fonction de la nature, de l'espèce à combattre mais aussi en fonction de la nature chimique de la principale substance active qui les compose (LNE, 2008 ; Roula, 2009).

#### 1.1.2.1. Classification biologique

Repose sur le type de parasites à contrôler. Il existe principalement trois grandes familles chimiques qui sont: les herbicides, les fongicides et les insecticides (LNE, 2008).

##### ❖ Les herbicides

Ce sont les produits phytosanitaires les plus utilisés dans le monde, dans toutes cultures confondues (Edelahi, 2004) dont l'action porte sur les mauvaises herbes (Balloy et al. 2004).

##### ❖ Les fongicides

Servant à combattre la prolifération des champignons pathogènes. Ils permettent également de lutter contre les maladies cryptogamiques qui causent de graves dommages aux végétaux cultivés (Chebab, 2008).

##### ❖ Les insecticides

Les insecticides agissent sur les insectes et les acariens (Balloy et al, 2004), empêche l'éclosion des œufs, altère aussi le développement normal des larves ou la maturation sexuelle (Chebab, 2008).

Outre les trois grandes familles de pesticides mentionnées ci-dessus, différentes familles peuvent être citées comme par exemple: les acaricides, les molluscicides et les corvicides (LNE, 2008).

#### 1.1.2.2. Classification chimique

La classification des insecticides tient compte de la nature chimique de la substance active majoritaire qui compose les produits phytosanitaires. Les principaux groupes chimiques sont les organochlorés, les organophosphorés, les carbamates et les pyrethroïdes (LNE, 2008).

##### ❖ Les organochlorés

Ce sont des molécules préparées par chloration d'hydrocarbures aromatiques, le DDT (Dichloro-Diphényl-Trichloréthane) fut en quelques sortes le précurseur de cette famille avec sa suite l'apparition de l'aldrine, de la dieldrine de l'héptachlore et du lindane (Chebab, 2008). Ces PPS(Produits phytosanitaires) ont une longue rémanence et

constituent un danger pour les humains et l'ensemble des être vivants car ils peuvent rester dans l'environnement, plusieurs mois voir même plusieurs années avant d'être dégradés (Roula, 2009). Leur emploi a par conséquent été interdit par l'OMS depuis 1972 et la convention de Stockholm (2001 et 2003). Le plus part de ces insecticides ont été retirés du marché mondial (Bouchon et Lemoine, 2003).

#### ❖ Les organophosphoré

Ce sont des esters obtenus en faisant réagir divers alcools avec l'acide ortho phosphorique ou l'acide thiophosphorique (Dimefox, Schradan, parathion, Malthion) (Chebab, 2008). Du fait de leur plus faible rémanence les organophosphorés ont remplacé les composés organochlorés (Roula, 2009).

Les organophosphorés ont une action inhibitrice irréversible de l'acétyl cholinestérase au niveau des terminaisons nerveuses et une toxicité aiguë élevée. Leurs temps de demi-vie dans l'atmosphère sont courts s'étalant de quelques minutes à quelques heures (EPA., 2004).

#### ❖ Les carbamates

Les carbamates ont une action anticholine estérasique réversible, ce sont des substances qui dérive de l'acide carbonique et dont la demis vie varie de quelques jours à plusieurs années dans les eaux souterraines, leur toxicité varie aussi selon la matière activée. Ces carbamates comprennent un grand nombre de PPS couramment utilisés tels que l'aldicarbe le carbofuran, méthomyl, le carbaryl et le propoxure.

Des dérivés soufrés des carbamates sont aussi couramment utilisés notamment comme fongicides, ce sont des dithio-carbamates dans le manèbe, le zinèbe et le monozebe (Bouchon et Lemoine, 2003).

#### ❖ Les pyréthrinoides

Les pyréthrinoides de synthèse sont des esters dérivés d'un noyau cyclopropane qui sont de nos jours fréquemment utilisés. Leur emploi comme insecticide naturel de poudre de fleurs séchées de pyrèthre est connu depuis des siècles. Ces PPS se caractérisent par une instabilité chimique et donc forte biodégradabilité qui leur confèrent une faible toxicité notamment chez les vertèbres supérieures.

Ces insecticides présentent une toxicité sélective et par conséquents leur action sur les mammifères est beaucoup plus limitée. Les plus couramment utilisés sont la perméthrine, la cyperméthrine, le fenvalérate, la deltaméthrine et la lombdacyholothrine. Cependant la plupart de ces molécules présentent une toxicité élevée pour les poissons et les bactéries (Roula, 2009).

### 1.1.3. Utilisation des pesticides

La directive européenne 91/414/CE du 15 juillet (1991) concernant la mise sur le marché de produits phytosanitaires, les définit comme étant:

Les substances actives et les préparations contenant une ou plusieurs substances actives qui sont présentes sous la forme dans laquelle elles sont livrées à l'utilisateur et qui sont destinées à :

- ✓ Protéger les végétaux ou les produits végétaux contre tous les organismes nuisibles ou à prévenir leur action.
- ✓ Exercer une action sur les processus vitaux des végétaux pour autant qu'il ne s'agisse pas de substances nutritives.
- ✓ Assurer la conservation des produits végétaux pour autant que les substances ou les produits ne fassent pas l'objet de dispositions particulières du conseil ou de la commission concernant les agents conservateurs.
- ✓ Détruire les végétaux indésirables.
- ✓ Détruire les parties de végétaux, freiner ou prévenir une croissance indésirable des végétaux».

#### 1.1.4. Mode d'action des pesticides

##### 1.1.4.1. Les herbicides

Les principaux processus métaboliques perturbés par les herbicides chez les organismes chlorophylliens sont variés. Ils peuvent provoquer des blocages de la photosynthèse, de la division cellulaire ou une inhibition de la biosynthèse des acides aminés et des protéines, des lipides et de cellulose (Roula, 2009; LNE, 2008).

##### 1.1.4.2. Les insecticides

Les insecticides agissent en divers points et leurs modes d'action sont divers:

- ✓ Action sur le système nerveux (neurotoxique).
- ✓ Action sur la respiration: par inhibition de la phosphorylation oxydative dans la mitochondrie (Roula, 2009 ; LNE, 2008).

##### 1.1.4.3. Les fongicides

Les fongicides s'attaquent aux spores bloquant les divisions cellulaires des champignons en agissant soit par action directe sur l'organisme visé en troublant son métabolisme (respiration, biosynthèse des acides nucléiques des stéroïdes ou des protéines) ou sa physiologie (reproduction) soit après transformation en produits cytotoxiques par la plante traitée (Roula, 2009; LNE, 2008).

#### 1.1.5. La toxicité des pesticides

Compte tenu de l'utilisation importante de pesticides, des résidus de pesticides peuvent être retrouvés dans les différents environnements (Eaux, sols, air et dans les denrées alimentaires), (Balloy et al., 2004) qui constituent un risque potentiel pour les consommateurs (LNE, 2008).

Les risques sanitaires liés à l'exposition des personnes aux pesticides peuvent être liés à des intoxications aiguës des utilisateurs (Balloy et al., 2004). Certains produits peuvent présenter une toxicité aiguë importante mais pouvant être éliminés facilement par l'organisme, à l'inverse d'autres substances, de toxicité aiguë moindre peuvent s'accumuler dans l'organisme et induire des effets à plus long terme (LNE, 2008). Ces risques à long terme quand à eux, sont plus difficiles à apprécier (Balloy et al., 2004).

Quelques études menées à travers le monde portent sur les impacts sur la santé de l'utilisation de tels produits chimiques. Dans une littérature scientifique, il a été montré que les résidus de pesticides peuvent entraîner des effets néfastes sur la santé comme des troubles de la reproduction, de développement et du système nerveux, il y a aussi des risques modérés d'une mauvaise application des pesticides incluent des maux de tête, des éruptions cutanées, ou encore des troubles de la vision (Rekha, 2005). Par ailleurs, une autre étude menée par d'autres chercheurs, a mis en évidence que l'exposition aux pesticides pouvait entraîner un dérèglement du système immunitaire (Rekha, 2005).

L'équipe de Meyer et ses collaborateurs (2003) ont montré que chez les agriculteurs, les cancers de la prostate et de l'estomac étaient plus fréquents. La présence de pesticides dans le lait maternel pourrait également expliquer le mauvais développement du fœtus et les malformations congénitales (LNE, 2008).

## 1. 2. Endosulfan

### 1.2.1. Définition

L'endosulfan est un hydrocarbure cyclodiène chloré, de la famille chimique des organochlorés, contenant seulement une double liaison organochloré (Extonext, 1995). C'est un insecticide et acaricide à la fois, sa mise sur le marché remonte au milieu des années 1950, mais des produits intéressant la production végétale contenant de l'endosulfan est encore utilisée dans un certain nombre de pays de par le monde (Stockholm, 2007). L'endosulfan est composé des stéréo-isomères alpha et bêta (Brignon, 2006).

### 1.2.2. Structure

La structure de l'endosulfan renferme deux isomère alpha et bêta (figure 1), d'une formule global  $C_9H_6Cl_6O_3S$  et de masse moléculaire 406.95g/mole (Stockholm, 2007).

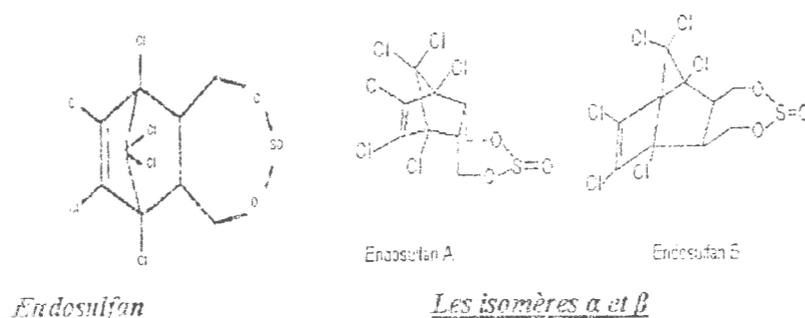


Figure 1 : Les isomères de l'endosulfan.

### 1.2.3. Mode d'action

L'endosulfan est un pesticide qui agit comme un poison de contact ou d'ingestion sur une grande variété d'insectes et d'acariens, son mode d'action vise à bloquer les récepteurs du neurotransmetteur acide 4-aminobutanoïque (GABA) du système nerveux central (Brignon, 2006).

### 1.2.4. Propriétés physico-chimiques

#### 1.2.4.1. Propriétés chimiques (OMS, 1965)

L'endosulfan se caractérise par les propriétés chimiques suivantes :

- ❖ **Nom chimique** : 6, 7,8, 9, 10,10-hexachloro- 1, 5,5a ,6 ,9 ,9a- hexahydro-6,9-méthano-2,3 ,4- benzo- dioxathiepin-3- oxide. Il existe sous deux formes stéréoisomériques, soit l'alpha -Endosulfan ( $\alpha$ ) ou le bêta -Endosulfan (B). Le rapport isométrique ( $\alpha$  :  $\beta$ ) est 70/30.
- ❖ **Masse volumique** : 1,7 45g/Cm<sup>3</sup>.
- ❖ **Densité de gaz** : 14,1.

#### 1.2.4.2. Propriétés physiques

L'essentiel des propriétés physiques de l'endosulfan sont les suivant :

- ❖ L'endosulfan se présente sous forme de cristaux bruns, stable à la lumière, modérément volatil dans l'air et relativement peu solubles dans l'eau (Tomlin, 1994).
- ❖ L'endosulfan présente une affinité moins prononcée pour les lipides que la plupart des pesticides organochlorés apparentés. Par conséquent, il existe un moindre risque de bioamplification et d'accumulation de l'endosulfan dans les chaînes alimentaires terrestres (Agritox., 2007).
- ❖ La durée de demi-vie de l'endosulfan est de 120 jours. Ce paramètre, noté DT 50, représente le potentiel de dégradation de cette substance active, et sa vitesse de dégradation dans le sol (Agritox., 2007).
- ❖ L'endosulfan est facilement absorbé par le tractus gastro-intestinal et distribué vers les reins et le foie, et dans une moindre mesure, vers d'autres tissus. Cependant, des différences de distribution ont été observées entre les isomères, mais aussi pour ce qui concerne les métabolites (Agritox., 2007).

### 1.2.5. Production et utilisation

#### 1.2.5.1. Production

La production mondiale d'endosulfan a été estimée à ~10 000 tonnes par an au milieu des années 1980 (ATSDR, 2000).

En 2005, un seul site de fabrication européen a été recensé. D'après l'industriel ce site produit ~4 000 tonnes par an (EFSA, 2005 ; Van der Gon et al., 2005) dont la majeure partie est exportée hors communauté européenne (EFSA, 2005).

L'endosulfan est fabriqué à partir d'hexachlorocyclopentadiène par réaction diénique avec le butane-diol, suivie d'une cyclisation avec du chlorure de thionyle et cis-butène-1,4-diol (Brignon, 2006).

### 1.2.7.2. Devenir dans l'organisme

L'endosulfan peut pénétrer dans l'organisme vivant (homme ou animal) à travers les voies d'exposition (inhalation, voie orale, voie cutané...). Son absorption est très lente et incomplète environ 40 à 60% d'endosulfan est absorbé en 48h par le tractus gastro-intestinal et elle devient rapide en présence d'alcool, d'huile ou émulsifiant. La résorption est aussi lente, elle même favorisée par les graisses. (EFSA, 2005).

L'endosulfan résorbé sera distribué vers les reins et le foie, et dans une moindre mesure, vers d'autres tissus. Cependant, des différences de distribution ont été observées entre les isomères, mais aussi pour ce qui concerne les métabolites (EFSA, 2005).

Dès qu'il arrive dans le foie, une partie de l'endosulfan se métabolise rapidement en se transformant selon deux voies métaboliques pour former soit des sulfo conjugués ; soit des conjugués polaires et des conjugués sans soufre. (Dalsenter et al., 1999).

Presque toutes ces réactions de conjugaison sont effectuées avec P450 :  $\alpha$  - endosulfan est médiée par CYP2B6, CYP3A4 et CYP3A5 et  $\beta$  -isomère par le CYP3A4 et CYP3A5. (Dejonckheere et al., 1975).

Les métabolites de l'endosulfan et même l'endosulfan non métabolisé sont éliminés à travers les urines (10 à 13%), la bile (29 à 47%) ou excrétés dans la matière fécale (15 à 22%) après quelques jours voir une semaine de la pénétration (Dejonckheere et al., 1975).

### 1.2.8. Toxicité

L'endosulfan est classé dans la catégorie des produits techniques qui sont modérément dangereux, basée sur une DL50 orale chez le rat de 80mg/kg de poids corporel. Cette toxicité est en partie tributaire de la manière avec laquelle le pesticide est administré (ACTA, 2004).

L'endosulfan dilué dans les huiles ou les émulsifiants est plus toxique que l'endosulfan administré tel qu'il est d'une façon générale, l'isomère  $\alpha$  est apparu plus toxiques que l'isomère  $\beta$  (Extonext, 1995).

La base de données toxicologique relative à l'endosulfan comprend des études soumises par les titulaires et des études publiées. Chez le rat, l'endosulfan est fortement toxique en doses aiguës administrées par voie orale et par inhalation. Il est aussi très toxique par voie cutanée chez le lapin. L'endosulfan est modérément irritant pour les yeux et n'est pas un irritant cutané pour le lapin, ni un sensibilisant cutané pour le cobaye. Chez le rat, les femelles se sont montrées beaucoup plus sensibles aux effets des doses aiguës administrées par voie orale et cutanée que les mâles, et cette sensibilité accrue chez les femelles a également été notée dans des études de plus longue durée (Dalsenter et al., 1999).

L'endosulfan est un produit chimique très toxique pour pratiquement tous les types d'organismes. Il peut provoquer des dysfonctionnements du système endocrinien tant dans les espèces terrestres qu'aquatiques. C'est un produit neurotoxique, hématotoxique et néphrotoxique (Stockholm, 2007).

## 2.1 .Le système nerveux

### 2.1.1. Définition

Le système nerveux est un système fort complexe qui tient sous sa dépendance toutes les fonctions de l'organisme (Ramé et Théron, 2006), il est le système de régulation rapide de l'organisme, il comprend l'encéphale, la moelle épinière, les nerfs et les récepteurs sensoriels (Marieb, 2000).

Le système nerveux de tous les animaux a pour fonction de détecter les variations du milieu extérieur et intérieur et déclencher les réponses appropriées des muscles, des organes et des glandes (Crossman et Neavy, 2004).

### 2.1.2. Organisation et classification du système nerveux

Selon le docteur Marieb (2008):

Nous possédons un seul système nerveux, mais sa complexité est telle qu'il est difficile d'en considérer toutes les parties simultanément. Pour en faciliter l'étude, on le divise selon ses structures (classification structurale) et selon ses activités (classification fonctionnelle).

- La classification structurale qui englobe tous les organes du système nerveux, comprend deux subdivisions : le système nerveux centrale et le système nerveux périphériques.
- La classification fonctionnelle s'applique uniquement aux structures de SNP.
- Cette dernière contient deux voies : Sensitive et motrice.

La voie motrice c'est elle qui comprend les deux subdivisions qui sont : Le système nerveux somatique et le système nerveux autonome.

### 2.1.3. Anatomie du système nerveux

Le système nerveux est divisé arbitrairement en un système nerveux centrale (SNC) et un système nerveux périphérique (SNP). Le système nerveux centrale se compose du cerveau et de la moelle épinière. Le système nerveux périphérique se compose de nerfs rejoignant le cerveau et la moelle épinière (nerfs crâniens et nerf rachidien) (Crossman et Neavy, 2004).

#### 2.1.3.1. Le système nerveux central

Le système nerveux central, appelé aussi névraxe, comprend la moelle épinière et l'encéphale (Ramé et Théron, 2006), protégé par le crâne et la colonne vertébrale, c'est la partie la plus complexe du système nerveux, il contient la majorité des corps cellulaires et des connexions synaptiques (Crossman et Neavy, 2004).

Le tissu nerveux est mou et fragile, la nature a cependant veillé à la protection de l'encéphale et de la moelle épinière en les arbitrant avec les os (le crâne et la colonne vertébrale) des membranes (les méninges) et un coussin aqueux (le liquide cébrospinal) (Marieb, 2008).

### 2.1.3.1.1. L'encéphale

Logé à l'intérieur de la boîte crânienne (Ramé et Théron, 2006), il est la plus complexe des masses des tissus nerveux dans l'organisme, il est d'usage de décrire séparément ses quatre principales régions soit, les hémisphères cérébraux (le cerveau), le diencéphale, le tronc cérébral et le cervelet (Marieb, 2008).

### 2.1.3.1.2. La moelle épinière

La moelle épinière est logée dans le canal rachidien de la colonne vertébrale et continue dans le sens rostral, le bulbe rachidien du tronc cérébral. La moelle épinière reçoit des informations du tronc et des membres et les contrôle (Crossman et Neavy, 2004).

La moelle épinière est divisée en quatre régions (cervical, thoracique, lombaire et sacrée), chaque région spinale est subdivisée en segments et chaque segment forme une paire de nerfs spinaux bilatéraux. Juste avant qu'un nerf spinal rejoigne la moelle, il se divise en deux branches appelées les racines. La racine dorsale et chaque nerf spinal apportent spécifiquement les informations sensorielles. Le ganglion de la racine dorsale, un renflement de la racine dorsale, contient les corps cellulaires des neurones sensoriels. La racine ventrale transporte des informations venant du système nerveux central à la destination des muscles et des glandes (Silverthorn, 2007).

En coupe transversale, la substance grise de la moelle épinière présente la forme H ou d'un papillon qui entoure le canal de l'épendyme qui contient le LCR alors que la substance blanche de la moelle épinière comprend des neurofibres myélinisées et des neurofibres amyélinisés (Marieb, 2008).

### 2.1.3.2. Le système nerveux périphérique

Le système nerveux périphérique constitue le lien entre le SNC et les structures situées à la périphérie de l'organisme des quelles, il reçoit des informations sensibles et aux quelles, il envoie des impulsions de contrôle (Crossman et Neavy, 2004).

Le système nerveux périphérique est formé de l'ensemble des nerfs qui relient le système nerveux central aux organes, sensitifs et moteurs. Selon leur origine, ils se divisent en nerfs crâniens et en nerfs rachidiens (Ramé et Théron, 2006).

#### 2.1.3.2.1. Les nerfs

Un nerf est un organe en forme de cordon qui appartient au système nerveux périphériques, la taille des nerfs varie (Ramé et Théron, 2006). Un nerf est un ensemble de neurofibres situé à l'extérieur de SNC. Dans un nerf, chaque axone est entouré d'une mince couche de tissu conjonctif appelée endonèvre. Les axones sont groupés en fascicules par une enveloppe de tissu conjonctif plus épaisse que la première, le périnèvre. Enfin, tous les fascicules sont recouverts d'une gaine fibreuse résistante, l'épinèvre (Marieb, 2008).

### 2.1.3.2.2. Les nerfs crâniens

Les 12 paires de nerfs crâniens desservent la tête et le cou, seul les nerfs vagues s'étendent juste dans les cavités thoracique et abdominale (Marieb, 2000). On distingue trois types de nerfs crâniens : Les nerfs sensoriels ou sensitifs Les nerfs moteurs Les nerfs mixtes (moteurs et sensitifs) (Ramé et Thérond, 2006).

### 2.1.3.2.3. Les nerfs rachidiens

Les 31 paires de nerfs spinaux sont formées par l'union de leurs racines ventrales. Et de leurs racines dorsales (Marieb, 2008). Ce sont des nerfs mixtes qui contiennent des fibres sensibles et motrices. Les nerfs rachidiens sont groupés en plexus, on en compose six: le plexus cervical, le plexus brachial, les plexus lombaire, le plexus sacrés Le plexus honteux formé par le nerf honteux interne et le plexus sacro coccygien (Ramé et Thérond, 2006).

### 2.1.3.3. Le système nerveux autonome

Le système nerveux autonome est la partie du système nerveux périphérique qui préside aux activités automatiques de l'organisme (Marieb, 2008). Il est chargé de réguler la vie intérieure ou vie végétative. Cette régulation se faire de manière inconsciente (ce qui permet aux organes de continuer de fonctionner lors d'un état comateux ou lors du sommeil), il gère la sensibilité des viscères et règle leur fonctionnement. Il commande la musculature lisse, les fibres musculaires cardiaques et les glandes (Ramé et Thérond, 2006).

Il est divisé en deux systèmes particuliers :

#### 2.1.3.3.1. Le système sympathique

Les centres sympathiques sont situés dans la moelle épinière, étagés de la 8<sup>ème</sup> cervicale à la 2<sup>ème</sup> lombaire. Le système sympathique est accélérateur. Il active le fonctionnement des organes (Ramé et Thérond, 2006).

La partie sympathique c'est la partie du SNA qui dans la situations d'urgence nous prépare à la fuite ou la lutte, la partie sympathique déclenche divers adaptation qui nous aident à affronter, le stress (Marieb, 2008).

#### 2.1.3.3.2. Le système parasympathique

Il constitue de fibres nerveuses issues de deux sources :

- les fibres parasympathiques. Annexées à certains nerfs crâniens dont elles suivent le trajet.
- le centre parasympathiques situés dans la moelle épinière étagée sur les quatre premiers segments sacrés. Les effets du système parasympathique sont antagonistes (Ramé et Thérond, 2006).

La partie parasympathique du SNA s'active surtout dans les situations neutres. Elle est notamment associée au repos et à la digestion (Marieb, 2008).

### 2.1.4. Les principes fonctions du système nerveux

Le système nerveux remplit trois fonctions étroitement liées :

- premièrement, par l'intermédiaire de ces millions de récepteurs sensoriels, il reçoit de l'information sur les changements, qui se produisent tant à l'intérieur qu'à l'extérieur de l'organisme. Ces changements sont appelés stimulus, et l'information recueillie porte le nom d'information sensorielle.
- deuxièmement, il traite et interprète l'information sensorielle et détermine l'action à entreprendre à tout moment, ce qui constitue le processus de l'intégration.
- Troisièmement, il fournit une réponse motrice qui active les muscle ou les glandes (effecteurs) (Marieb, 2008).

### 2.1.5. La neurotoxicité

#### 2.1.5.1 Définition et effets des neurotoxiques

Un neurotoxique qui pourrait être l'origine de NDD (neuro developmental disorders). Ces NDD vont du simple défaut d'attention à des troubles beaucoup plus graves : Hyperactivité, THDA (troubles d'hyperactivité avec déficit de l'attention) difficulté d'apprentissage, retard mental sévère autisme (Labie, 2007).

Des neurotoxiques agissent sur l'ensemble des processus de développement : Prolifération, migration, différenciation, synaptogenèse, gliogénèse, myélinisation, apoptose et signalisation, cette vulnérabilité se prolonge jusqu'à l'adolescence (Ginsberg et al., 2004).

#### 2.1.5.2. Quelques produits neurotoxiques

##### • Le plomb

Le plomb est un métal présent partout dans notre quotidien. Il y'a près d'un siècle que des cas d'intoxication aigue par le plomb avaient été signalées en Australie chez des enfants qui en jouant avaient ingère des peintures au plomb. Ajoutant en France la découverte de cas de saturnisme, liés à la présence de fortes teneurs en plomb dans l'eau destinée à la consommation humaine dans les Vosges au début des années 1980 (Labie, 2007).

##### • Le méthyle mercure

Les premières observations ont été faites à minamata au Japon dans les années 1960 à l'occasion d'une épidémie de cécité et de retard mental chez des enfants dont les mères avaient consommé des eaux contaminées. De tels travaux menés en nouvelle Zélande et aux îles Féroé, ont noté des troubles de mémoire (Meyers et al., 2003).

##### • Le diphénylpolychlorés

Ces produits (PCB) ont été utilisés comme isolants électriques et des contaminations industrielles ont été décrites dans des pays asiatiques, Japon et Taiwan. Les études épidémiologiques mettent en évidence un déficit intra clinique du développement, hyperactivité, troubles de la mémoire et de l'attention (Labie, 2007).

- **Les solvants**

Les intoxications aiguës souvent professionnelles sont bien connues. Elles sont présentes dans les sociétés industrialisées et responsables de nombreuses intoxications touchant le système nerveux central ou périphérique (Labie, 2007).

- **Les alcools**

Les complications neurologiques de l'alcoolisme sont nombreuses, seules quelques-unes, peuvent être attribuées aux effets directs neurotoxiques de l'alcool : L'atrophie cérébrale, l'atrophie cérébelleuse et dans certains cas l'épilepsie (Ollat, 2004).

- **Le manganèse**

Le rôle du manganèse dans des maladies professionnelles est connu, entraînant des troubles neurodégénératifs voisins de la maladie de Parkinson, le manganèse existe dans des nappes phréatiques utilisées, pour l'eau de boisson et dans le lait de soja (Labie, 2007).

- **Les pesticides**

L'objectif de tout pesticide est de tuer une cible (insecte ravageur, parasite, champignon ...) la toxicité est donc intimement liée au produit lui-même (Courrière, 2005). On connaît plus de 600 insecticides, fongicides ou raticides. Un de leur mécanisme d'action serait une inhibition de la cholinestérase par les organophosphates.

Des modifications morphologiques ont aussi été signalées, l'exposition prénatale au chlorpyrifos est associée à une baisse des scores de développement à 36 mois ainsi qu'à un risque de THDA augmenté (Labie, 2007) parmi les effets les plus fréquents des pesticides en général sont :

**-Neurotoxiques :** Toxiques pour le système nerveux : La neurotoxicité pour les insectes se traduit par des perturbations du fonctionnement du système nerveux, chez l'homme les mécanismes fondamentaux sont les mêmes (par exemple l'acétylcholine, un neurotransmetteur essentiel du système nerveux de l'insecte et aussi de l'homme, les insecticides qui affectent directement ou indirectement le fonctionnement de ce neurotransmetteur (Courrière, 2005).

## 2.2. Stress oxydant

### 2.2.1. Définitions

Pour définir le stress oxydant il faut d'abord définir ce que sont les radicaux libres. Un radical libre est une espèce chimique possédant un électron célibataire qui lui confère une réactivité vis-à-vis d'autres molécules. Celle-ci est variable selon la nature du radical. En biologie les radicaux libres sont formés le plus souvent par gain d'électron à partir de l' $O_2$ . Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) regroupent l'ensemble des dérivés radicalaires de l'oxygène ( $O_2^-$ ,  $\cdot OH$ ,  $NO\cdot$ ,  $ROO\cdot$  ...), mais également les composés non radicalaires ( $ROOH$ ,  $H_2O_2$ ,  $^1O_2$ ).

Il est important d'évoquer alors le paradoxe de l' $O_2$  : il est indispensable au fonctionnement cellulaire mais est aussi la source des ROS qui peuvent être délétères pour les macromolécules biologiques (ADN, protéines, phospholipides membranaires...). Les ROS seraient impliqués dans la prolifération cellulaire, la mort cellulaire programmée et agiraient comme second messager (Droge, 2002 ; Thannichal et Fanburg, 2000).

Dans l'ensemble de nos tissus sains, les défenses antioxydantes sont capables de faire face et détruire les radicaux produits en excès. On dit que la balance antioxydants/proxydants est en équilibre. Mais dans certaines situations, en raison d'une surproduction radicalaire (tabac, alcool, pollution) ou d'une diminution des capacités antioxydantes (insuffisance d'apports des micronutriments antioxydants, inactivation enzymatiques) un déséquilibre entre production de radicaux libres et système de défense est à l'origine d'un état redox altéré de la cellule appelé stress oxydatif (Pincemail et *al.*, 1999 ; Pincemail et *al.*, 2000).

## 2.2.2. Les espèces réactives de l'oxygène et leur origine

### 2.2.2.1. Les radicaux libres oxygénés

Dans les molécules, les atomes sont assemblés par des liaisons covalentes établies par mise en commun d'électrons de spins opposés. Tout apport d'énergie suffisant est susceptible d'entraîner la rupture de ces liaisons et donc de donner naissance à des entités chimiques qui possèdent un électron non apparié, dit « célibataire », sur une orbitale externe. Ces entités chimiques sont appelées radicaux libres. Parmi les espèces radicalaires les plus intéressantes se trouvent les formes activées de l'oxygène. La réactivité particulière de l'oxygène est due à la structure biradicalaire de la molécule. En effet, si l'oxygène moléculaire est très stable vis-à-vis des substances à électrons appariés, la molécule réagit énergétiquement avec les radicaux libres. Ces derniers sont des espèces chimiques présentant un ou plusieurs électrons célibataires (le radical hydroxyle  $\cdot OH$ , l'anion superoxyde  $O_2^-$ , l'oxyde nitrique  $NO\cdot$ ...) (Curtin et *al.*, 2002).

Ils sont produits naturellement dans l'organisme (radicaux primaires) :

- au niveau de la respiration mitochondriale lorsque l'oxygène échappe à la réduction complète en  $H_2O$  ;
- au niveau de certains organites cellulaires tels que les peroxysomes ;
- par diverses oxydases cellulaires ;
- au cours de la phagocytose.

Ces radicaux libres primaires sont capables d'extraire un électron des molécules voisines pour compléter la vacance de leur orbital en produisant de ce fait d'autres radicaux libres dit secondaires, donc sont les sous produits des réactions d'oxydation et de réduction. D'autres espèces dérivées de l'oxygène dites espèces actives de l'oxygène, comme l'oxygène singulet  $^1O_2$ , le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) ou le nitroperoxyde ( $ONOOH$ ), ne sont pas des radicaux libres, mais sont aussi réactives et peuvent être des précurseurs de radicaux. L'ensemble des radicaux libres et de leurs précurseurs est souvent appelé espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Olanow, 1993 ; Favier, 2003 ; Dalton et *al.*, 2002).

La réactivité de ces espèces n'est pas uniforme chez les radicaux de l'oxygène. Cette réactivité étant très variable selon la nature du radical. Ainsi parmi les radicaux formés chez les êtres vivants, l'anion radicalaire superoxyde ( $O_2^-$ ) comme le monoxyde

d'azote ( $NO^{\cdot}$ ) ne sont pas très réactifs, mais constituent des précurseurs d'autres espèces plus réactives. La faible réactivité de ces deux radicaux permet d'ailleurs leur utilisation par l'organisme comme médiateurs régulant des fonctions biologiques telles la vasodilatation capillaire, la prolifération ou le message de neurones.

En revanche, des radicaux comme les radicaux peroxydes ( $ROO^{\cdot}$ ) ou surtout le radical hydroxyle ( $HO^{\cdot}$ ) sont extrêmement réactifs, et ce avec la plupart des molécules des tissus vivants. Ces radicaux libres de l'oxygène ou de l'azote, pourtant réactifs et toxiques, ils sont produits par divers mécanismes physiologiques afin de détruire des bactéries au sein des cellules phagocytaires (macrophages, polynucléaires) ou pour réguler des fonctions cellulaires létales telle la mort cellulaire programmée ou apoptose (Favier, 2003 ; Dalton *et al.*, 2002).

Les principaux radicaux libres oxygénés sont les suivants :

- *l'anion superoxyde* : la molécule d'oxygène, mise en présence d'une quantité d'énergie suffisante, peut acquérir un électron supplémentaire et former ainsi l'anion superoxyde :



Cet anion intervient comme facteur oxydant dans de nombreuses réactions

- *le radical hydroxyle* :  $^{\cdot}OH$ , Il est très réactif vis-à-vis des structures organiques et joue un rôle initiateur dans l'auto-oxydation lipidique

- *le radical peroxyde* :  $ROO^{\cdot}$

- *l'oxygène singulet* :  $^1O_2$ , forme « excitée » de l'oxygène moléculaire, est souvent assimilé à un radical libre en raison de sa forte réactivité.

Le reste des radicaux libres et la comparaison entre leur pouvoir oxydant sont donnés dans le tableau 2.

**Tableau 2 : Principaux radicaux libres et comparaison de leur pouvoir oxydant (Crompton, 1999).**

Radicaux libres (nomenclature)	Structure chimique
Anion superoxyde	$O_2^{\cdot -}$
Radical hydroxyle	$^{\cdot}OH$
Radical hydroperoxyde	$HOO^{\cdot}$
Radical peroxyde	$ROO^{\cdot}$
Radical alkoxyde	$RO^{\cdot}$
Peroxyde d'hydrogène*	$H_2O_2$
Radical oxyde nitrique	$NO^{\cdot}$
Peroxynitrite	$ONOO^{\cdot}$
Hypochlorite	$ClO^{\cdot}$

**Pouvoir oxydant:**  $^{\cdot}OH > RO^{\cdot} > HOO^{\cdot} > ROO^{\cdot} > NO^{\cdot}$

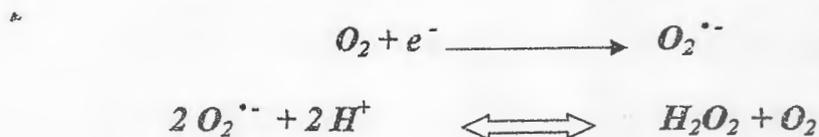
\* Espèce active de l'oxygène, non radicalaire

### 2.2.2.1.a. L'origine endogène des ROS (Dalton et al., 2002 ; Fulbert et Cals, 1992 ; Yoshikawa et al., 2000 ; Halliwell et Gutteridge, 2007).

Les radicaux libres sont issus du métabolisme physiologique mais ils peuvent aussi être, produits lors de « déviations » du métabolisme cellulaire. En effet, la respiration oxydative est la principale source d'énergie pour les cellules aérobies. L'acétylcoenzyme A issue des métabolismes glucidique, protidique et lipidique entre dans le cycle de KREBS pour l'oxydation complète du reste acétyle en  $CO_2 + H_2O$ . Les électrons sont transportés via la chaîne respiratoire, sous forme de coenzymes réduites (FADH<sub>2</sub>, NADH) qui vont transférer leur pouvoir réducteur sur les systèmes transporteurs d'électrons de la chaîne respiratoire et permettre la synthèse d'ATP. Ce transfert d'électron est soldé par la synthèse de l'eau à partir de l'oxygène dans l'étape ultime de la chaîne respiratoire mitochondriale :



Cependant, une réduction incomplète de l' $O_2$  peut apparaître pour 1 à 2% de l'oxygène moléculaire conduisant alors à la formation de radicaux libres oxygénés : l'oxygène singulet  $^1O_2$  et surtout l'anion  $O_2^{\cdot -}$ . Si ce dernier est libéré dans un milieu dépourvu de protons, il peut exercer ses effets délétères : de tels milieux se rencontrent au sein des doubles couches phospholipidiques des membranes cellulaires dont la structure aurait tendance à augmenter la durée de vie des radicaux libres. Si cet anion est libéré dans un milieu protoné, il subit une dismutation, que ce soit spontanément ou en présence d'une dismutase, phénomène au cours duquel l'anion  $O_2^{\cdot -}$  dismute en eau oxygénée :



Il faut noter que la formation initiale de l'anion superoxyde est à l'origine du phénomène radicalaire car en donnant le peroxyde d'hydrogène par dismutation ce dernier peut alors se transformer en radical hydroxyle  $\cdot OH$  par la réaction de Fenton:



Le peroxyde d'hydrogène est susceptible de réagir avec le radical superoxyde en donnant également le radical hydroxyle selon la réaction de Habber-Weiss :



La vitesse de la réaction de dismutation de l' $O_2^{\cdot -}$  est maximale à pH = 4,8, mais est très lente à pH = 7. C'est pourquoi la cellule a besoin d'un superoxyde dismutase pour accélérer cette réaction en multipliant sa vitesse par  $10^{10}$  au pH physiologique.

D'une manière générale, la durée de vie des radicaux libres est très courte ( $10^{-4}$ s) et aussi instable. Ils sont très réactifs car ils cherchent un électron afin de réappairier leur électron célibataire. Ceci peut se faire au coût de la création d'un nouveau

radical libre et alors une propagation en chaîne s'installe. Ce processus intracellulaire est limité par la compartimentation cellulaire et peut s'arrêter par :

- La recombinaison des radicaux libres entre eux :



Ceci est possible s'il s'agit de chaînes organiques contenant uniquement des liaisons saturées

- Des systèmes antioxydants entraînant le piégeage des radicaux libres. Il s'agit d'enzymes (superoxyde dismutases, catalase, peroxydases) et de molécules telles que le glutathion.

Quand l'organisme subit une attaque bactérienne, la réaction du système immunitaire est de *facto* par une inflammation accompagnée de cellules phagocytaires activées qui libèrent des enzymes, des médiateurs chimiques tels que l'histamine et la sérotonine, et l'anion superoxyde accompagné d'autres dérivés oxygénés comme l'acide hypochloreux (HClO) et les radicaux  $\cdot OH$ ,  $H_2O_2$  et  $^1O_2$ .

En effet, la phagocytose des germes bactériens s'accompagne, d'une production massive d'anions superoxydes par le métabolisme leucocytaire : c'est ce qu'on appelle la «flambée respiratoire» (Respiratory burst). Une NADPH oxydase, activée par la protéine kinase C et l'acide arachidonique libéré par la phospholipase A2 (PLA2) intervient et permet la synthèse de  $O_2^{\cdot -}$  au prix d'une forte consommation d' $O_2$  (Tillement, 2001 ;Henderson et *al.*,1989 ;Rahan et *al.*,1996).



Les anions superoxydes produits subissent une dismutation soit spontanée soit enzymatique.

Au cours de la phagocytose et la formation de phagosome, ce dernier referme une enzyme s'appelant la myéloperoxydase, catalyse en présence de  $H_2O_2$  et d'ions  $Cl^-$  la formation de dérivés halogénés toxiques :



L'hypochlorite en captant un proton peut réagir à son tour avec les fonctions amines ou lion ammonium pour donner des chloramines :



Ainsi qu'en présence de  $H_2O_2$  l'acide hypochloreux peut donner l'oxygène singulet



Lors de la phagocytose donc, il y a formation d'un taux élevé de radicaux libres oxygénés ( $\cdot OH$ ,  $H_2O_2$ ,  $O_2^{\cdot -}$  et  $^1O_2$ , rajoutés à ceux-là les chloramines possédant une vertu bactéricide. L'ensemble de ces substances est engagé dans la lutte contre les infections microbiennes en lysant les agents microbiens phagocytés. Dans le cas d'une granulomatose septique ou une inhibition de la myéloperoxydase par une corticothérapie, l'organisme devient alors fragile et très sensible aux agressions microbiennes.

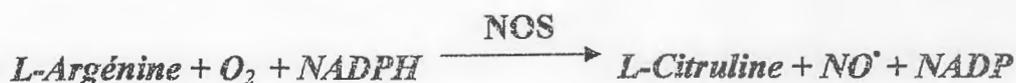
Par ailleurs, la biosynthèse des prostaglandines est amorcée à *priori* par la libération de l'acide arachidonique des phospholipides membranaires par l'action hydrolytique de PLA<sub>2</sub>. Deux enzymes, la lipooxygénase et la cyclooxygénase, liées aux membranes plasmiques et microsomales, transforment l'acide arachidonique libéré en dérivés tels que le thromboxane, les prostaglandines ou les leucotriènes. Après action de la lipooxygénase, la transformation d'un hydroperoxyde, l'acide hydroperoxyeicosatétraénoïque (HPETE) en acide hydroxyeicosatétraénoïque (HETE) s'accompagne de la libération du radical hydroxyle  $\cdot OH$  (Hill et al., 1996).

De manière générale, toute réaction biochimique faisant intervenir de l'oxygène moléculaire est susceptible d'être à l'origine d'une production de radicaux libres oxygénés. La xanthine-déshydrogénase est une enzyme ubiquitaire impliquée dans le catabolisme de l'ATP. Au décours des phénomènes d'ischémie-reperfusion, cette enzyme est modifiée en xanthine-oxydase qui génère du superoxyde en présence d'oxygène et de xanthine ou d'hypoxanthine :



\* Ainsi, cette voie de production de dérivés réactifs de l'oxygène participe probablement au stress oxydatif chez tout patient présentant une pathologie ischémique, que celle-ci soit facilement (infarctus) ou difficilement reconnue (états de choc, bas débits régionaux sévères, microthromboses) (Harrison, 2002).

Par ailleurs, beaucoup de cellules sont capables de produire du monoxyde d'azote  $NO^{\cdot}$  à partir d'arginine et d'oxygène, dans une réaction catalysée par la NO-synthase (NOS). Cette production est physiologique et joue par exemple un rôle majeur dans le tonus vasculaire (Servais, 2004).



Une seconde forme de NO-synthase existe : sous l'action des cytokines et des endotoxines libérées lors d'un sepsis, cette forme est inductible et produit de grandes quantités de  $NO^{\cdot}$ .

À forte concentration, le  $NO^{\cdot}$  devient délétère pour les cellules, notamment en réagissant avec un radical superoxyde  $O_2^{\cdot -}$  pour former un puissant oxydant : le peroxy-nitrite  $ONOO^{\cdot}$ . En outre, le peroxy-nitrite peut secondairement se décomposer en d'autres oxydants ( $NO^{\cdot}_2$ ,  $\cdot OH$ , etc.).

Le réticulum cytoplasmique renferme des enzymes qui catalysent des réactions pour détoxifier les drogues liposolubles et d'autres produits métaboliques toxiques. La plus

connue de ces enzymes est le cytochrome P450 qui oxyde les acides gras insaturés et les xénobiotiques et produit ainsi des ROS. Il semble que cette production radicalaire régule les fonctions du réticulum comme par exemple la sécrétion des protéines.

Dans le peroxysome également il y a une production intense des  $H_2O_2$  car cet organisme renferme de nombreuses enzymes générant le peroxyde. Toutefois ce dernier est utilisé comme substrat par la catalase peroxysomiale afin de réaliser des réactions de peroxydation d'autres substrats. Ces réactions sont importantes dans le processus de détoxification présent dans le foie et le rein (Servais, 2004).

### 2.2.2.1.b. L'origine exogène des ROS

L'organisme humain est soumis à l'agression de différents agents capables de donner naissance à des radicaux libres. Les rayonnements UV induisent la synthèse de radicaux libres du type  $O_2^-$ ,  $\cdot OH$ ,  $^1O_2$  et de molécules génératrices de radicaux libres tel que  $H_2O_2$ , par l'intermédiaire d'agents photosensibilisants. Par ailleurs les radiations ionisantes provoquent également la génération de radicaux libres dérivés de l'oxygène.

L'ingestion d'alcool est suivie de la formation de radicaux libres selon divers mécanismes. La xanthine oxydase et l'aldéhyde oxydase peuvent oxyder le principal métabolite de l'éthanol, l'acétaldéhyde, avec production d' $O_2^-$ . L'éthanol stimule également la production d'anion superoxyde par induction de la synthèse des *NADPH* oxydase, *NADPH* cytochrome réductase, et du cytochrome P 450. Enfin, *Schisler et Singh* (Schisler and Singh, 1989) ont montré que l'alcool pouvait diminuer l'activité des enzymes de protection (SOD-GSH-Px). De même, les concentrations sériques en sélénium et vitamine E sont abaissées chez les alcooliques et corrélées avec une atteinte hépatique plus ou moins sévère. Des toxiques tels que l'oxyde d'azote (*NO*) et le dioxyde d'azote ( $NO_2$ ), présents dans notre environnement (suies, goudron, tabac, polluants industriels), participent à la genèse de radicaux libres : ils sont responsables d'une auto-oxydation des acides gras polyinsaturés des alvéoles pulmonaires.

La réaction peut être réversible :



Ou irréversible:



*NO* et  $NO_2$  peuvent aussi réagir avec le peroxyde d'hydrogène produit par les macrophages au niveau des alvéoles pulmonaires et donner naissance à des radicaux

$\cdot OH$ . La fumée de cigarette joue un rôle majeur dans la formation de ces espèces radicalaires : elle contient *NO* et  $NO_2$ , renferme de fortes concentrations en composés insaturés et stimule, par son action irritante, les macrophages des alvéoles pulmonaires. D'autres toxiques agissent par transfert d'électrons. Il en est ainsi du tétrachlorure de carbone ( $CCl_4$ ) dont la toxicité s'exerce par l'intermédiaire des radicaux  $CCl_3^{\cdot}$  et mis en évidence dans des hépatocytes de rat par résonance paramagnétique électronique (RPE). La réduction de  $CCl_4$  en  $CCl_3^{\cdot}$  s'effectue, soit sous l'action du cytochrome P450

hépatique  $CCL_4 + e^- \rightarrow Cl^- + CCl_3^{\cdot}$ , soit en présence de fer ferreux  $CCL_4 + Fe^{+2} \rightarrow + Fe^{+3} + CCl_3^{\cdot}$ . *KNECHT et MASON en 1988* (Knecht et Mason, 1988), ont montré que le  $CCl_3^{\cdot}$  était capable d'induire l'auto-oxydation des acides gras polyinsaturés, et donc de provoquer une augmentation importante des hydroperoxydes lipidiques.

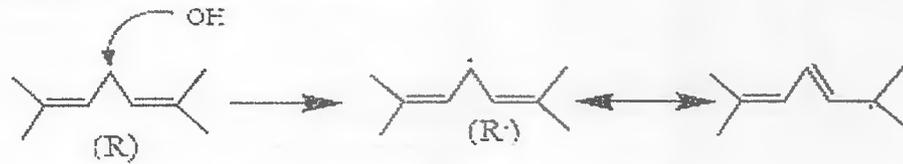
Par ailleurs, des antibiotiques anticancéreux, tels que les anthracyclines, sont également capables de générer des radicaux libres. La formation d'espèces radicalaires serait responsable de leur mode d'action anticancéreux et de leur toxicité (Le Bot et al. 1988 ; Pein et al., 1995 ; Germain et al., 2003). Ils agissent selon un mécanisme de transfert d'électrons. Des travaux réalisés sur des cultures de cellules tumorales mammaires, l'adriamycine est bioactivée en radical semiquinone de l'adriamycine ( $SQ^{\cdot}$ ) par réduction enzymatique (cytochrome P450). Ce radical peut réagir avec l'oxygène pour former l'anion superoxyde. Pour une autre anthracycline, la daunorubicine (DOS), la réduction en radical libre ( $DSO^{\cdot}$ ) se réalise alors que la molécule est déjà intercalée dans l'ADN (Sinha et al., 1989) Enfin, sur des cultures de cardiomyocytes, l'épirubicine, un autre dérivé des anthracyclines, s'avère inducteur d'une toxicité avérée modifiant les propriétés physicochimiques des membranes cellulaires par la génération des radicaux libres (Germain et al., 2003).

### 2.2.3. Rôle pathologique des espèces actives de l'oxygène (Favier, 2003 ; Halliwell et Cross, 1994).

Les travaux de Halliwell et ces collaborateurs ont bien montré le rôle des radicaux libres et des espèces oxygénées réactives dans la genèse de nombreuses maladies. En effet, La production excessive de radicaux libres provoque des lésions directes de molécules biologiques (oxydation de l'ADN, des protéines, des lipides, des glucides), mais aussi des lésions secondaires dues au caractère cytotoxique et mutagène des métabolites libérés notamment lors de l'oxydation des lipides. L'organisme peut aussi réagir contre ces composés anormaux par production d'anticorps, qui malheureusement peuvent aussi être des auto-anticorps créant une troisième vague d'attaque chimique.

#### *Toxicité cellulaire des radicaux libres : Conséquences biochimiques*

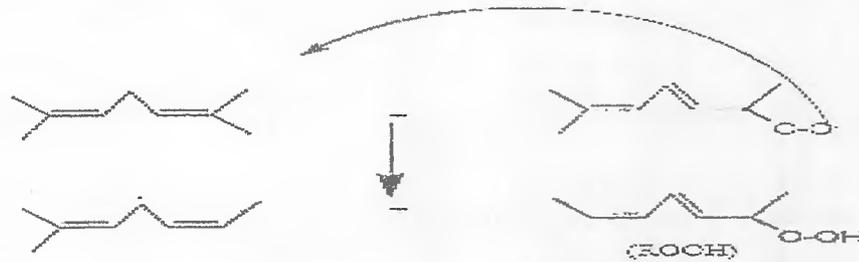
- **Les lipides** : Les lipides et principalement leurs acides gras polyinsaturés sont la cible privilégiée de l'attaque par le radical hydroxyle capable d'arracher un hydrogène sur les carbones situés entre deux doubles liaisons, pour former un radical diène conjugué, oxydé en radical peroxyde. Cette réaction appelée peroxydation lipidique forme une réaction en chaîne car le radical peroxyde formé se transforme en peroxyde au contact d'un autre acide gras qui forme un nouveau radical diène conjugué. Les hydroperoxydes peuvent subir plusieurs modes d'évolution : être réduits et neutralisés par la glutathion peroxydase ou continuer à s'oxyder et à se fragmenter en aldéhydes acides et en alcanes (éthane, éthylène, pentane) qui, de par leur volatilité, sont éliminés par voie pulmonaire. Le radical peroxyde, après évolution en un peroxyde cyclique et coupure de la molécule, peut libérer différents aldéhydes toxiques dont le malonaldaldéhyde ou l'hydroxynonanal. La transmission en chaîne de la réaction de peroxydation lipidique est stoppée par la vitamine E intercalée dans la bicouche lipidique des membranes. On peut détailler le mécanisme de cette peroxydation en trois étapes consécutives, figure 2, (Fulbert et Cals, 1992).

Etape 1 : Initiation

Le radical formé ( $R\cdot$ ) subit un réarrangement interne, dû à une tautomérie liée au déplacement de la double liaison la plus proche de l'électron célibataire, et existe donc sous 2 formes en équilibre.

Etape 2 : Adition de l'oxygène

En présence d'oxygène, il se forme un radical peroxyde ( $ROO\cdot$ ).

Etape 3 : Propagation et amplification

**Figure 2 : Le mécanisme de la peroxydation lipidique.**  
(Fulbert et Cals, 1992).

Le radical peroxyde ( $ROO\cdot$ ) qui déstabilise une deuxième molécule d'AGPI et conduit à un hydroperoxyde lipidique ( $ROOH$ ) et à un nouveau radical ( $R\cdot$ ). Cette auto-oxydation se propage et s'amplifie d'un acide gras à l'autre.

Les implications chimiques et les différents produits engendrés par ce mécanisme sont résumés dans la figure 3.

Les conséquences biologiques du stress oxydant seront extrêmement variables selon la dose et le type cellulaire. De légers stress augmenteront la prolifération cellulaire et l'expression de protéines d'adhésion, des stress moyens faciliteront l'apoptose, alors que de forts stress provoqueront une nécrose et des stress violents désorganiseront la membrane cellulaire, entraînant des lyses immédiates. De nombreuses autres anomalies biologiques sont induites par le stress oxydant : mutation, carcinogenèse, malformation des foetus, dépôt de protéines anormales, fibrose, formation d'auto-anticorps, dépôt de lipides oxydés, immunosuppression (Favier, 2003) (Figure 5).

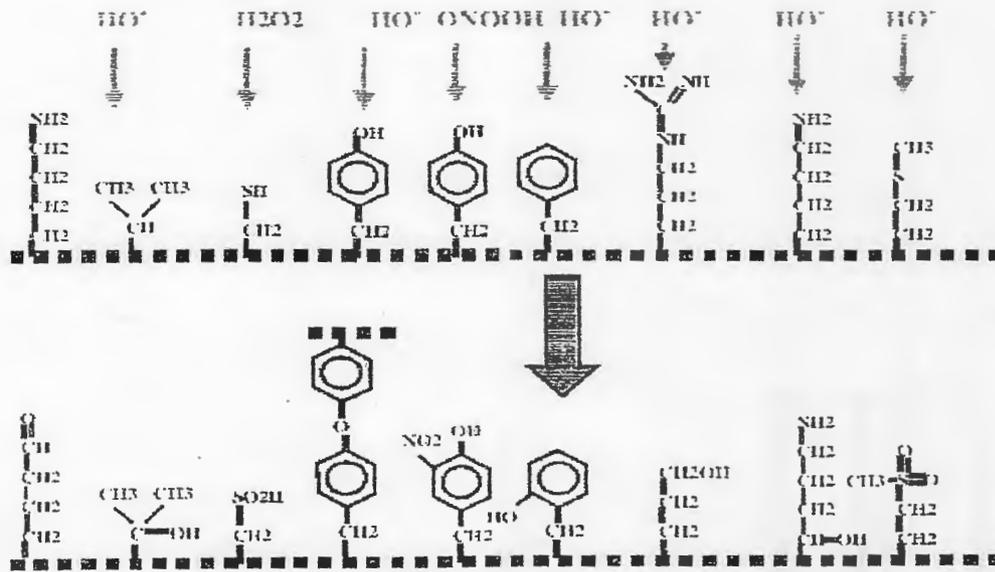


Figure 5: Nature de quelques modifications des chaînes latérales d'acides aminés des protéines après attaque radicalaire, (Favier, 2003).

2.2.4. Les systèmes de contrôle des radicaux libres par la cellule (Favier, 2003 ; Servais, 2004 ; Gardés-Albert et al., 2003 ; Avissar et al., 1989).

4.a. Systèmes de contrôle endogènes

Les cellules utilisent de nombreuses stratégies antioxydantes et consomment beaucoup d'énergie pour contrôler leur niveau d'espèces réactives de l'oxygène. En effet, l'organisme humain possède des systèmes enzymatiques, tels que les superoxyde-dismutases et la catalase qui jouent un rôle de protection, ainsi que les glutathion-peroxydases (GSH-Px) qui jouent un rôle de détoxication.

• Les super oxydes dismutase :

Cette enzyme assure l'élimination de l'anion superoxyde, première espèce toxique formée à partir de l'oxygène, elle assure ainsi, la première ligne de défense contre le stress oxydant. Le mécanisme réactionnel est catalysé par un métal situé au cœur de l'enzyme dont la nature distinguera les superoxyde-dismutases :

- SOD à manganèse (Mn-SOD) : protégeant la mitochondrie.
- SOD à cuivre zinc, protégeant le cytosol (cCu-ZnSOD)
- La face externe de la membrane des cellules endothéliales (ecCu-ZnSOD).
- Le plasma sanguin (pCu-ZnSOD)

Les superoxyde-dismutases sont utilisées en thérapeutique : dans les maladies inflammatoires chroniques, les anions superoxydes relargués par les phagocytes activés stimulent et amplifient la réponse inflammatoire. L'administration de SOD peut prévenir les lésions tissulaires dues à l'anion superoxyde. Les SOD semblent également réduire l'étendue de l'infarctus du myocarde (Avissar et al., 1989).

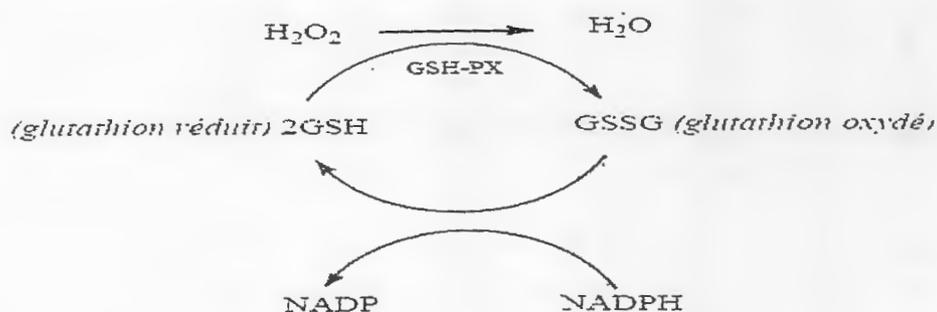
• **Les glutathion-peroxydases (GPx)** : Ses enzymes sont séléno-dépendantes contenant 4 atomes de sélénium situés aux centres actifs de l'enzyme sous forme de sélénocystéine. Elles se trouvent dans le cytosol, la mitochondrie, le réticulum endoplasmique et le noyau. Un déficit en sélénium entraîne une chute de l'activité de l'enzyme et une réplétion la restaure. Ces enzymes sont, sans doute le principal système de protection car elles détruisent non seulement  $H_2O_2$ , mais aussi les peroxydes organiques toxiques formés par l'oxydation des acides gras ou du cholestérol. L'activité de ces enzymes est très dépendante de l'apport nutritionnel en sélénium.

Avissar et al. (Avissar et al., 1989) ont, à partir de cultures cellulaires, individualisé 2 formes de GSH-Px qui diffèrent par leur structure, leur activité et leurs sites antigéniques :

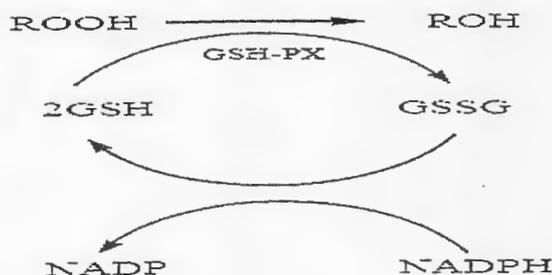
- une forme à localisation intracellulaire
- une forme glycosylée riche en ponts disulfures, à localisation extracellulaire.

Les GSH-Px ont une action détoxifiante vis-à-vis de 2 substrats :

- **le peroxyde d'hydrogène :**



- **les hydroperoxydes (ROOH) dérivés des lipides :**



L'activité de détoxification des GSH-Px face aux hydroperoxydes nécessite une autre enzyme, la PLA<sub>2</sub>. Cette phospholipase libère les peroxydes d'acides gras des membranes cellulaires en hydrolysant les fonctions esters des phospholipides membranaires. Les peroxydes libérés dans le cytosol sont alors transformés par la GSH-Px tandis que la chaîne d'acides gras manquante est resynthétisée.

- **La catalase (CAT) :** La catalase réagit efficacement avec le  $H_2O_2$  pour donner de l'eau et l' $O_2$  :



La CAT est localisée principalement dans le peroxyosome, mais elle se trouve aussi dans le cytoplasme. La GPx et la CAT permettent ainsi l'élimination de  $H_2O_2$ . Toute fois la CAT semble jouer un rôle plus important en présence de forte concentration de  $H_2O_2$ , ainsi elle empêche le peroxyde d'hydrogène de participer à la réaction de Fenton, alors que la GPx prend en charge le hydroperoxydes et  $H_2O_2$  même en faible quantité, pour lesquels elle est considérée la source majeure de protection (Favier, 2003 ; Servais, 2004).

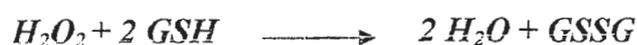
- **Les thioredoxines peroxydases (Prx) :** Ce sont des petites protéines à activité antioxydante, localisées dans le cytosol, les mitochondries, les peroxyosomes, associés aux noyaux et aux membranes. Ces protéines exercent leur rôle antioxydant à travers une activité peroxydase, où l' $H_2O_2$ , le peroxyde d'hydrogène et de nombreux hydroperoxydes sont les substrats. Ils jouent un rôle très important dans la détoxification vue leur quantité importante (0.1 à 0.8% de protéines solubles cellulaires) et leur large distribution dans la cellule (Servais, 2004).

- **L'hème oxygénase (HO) :** Le système oxygénase permet la conversion de l'hème en monoxyde de carbone, en biliverdine et en fer : L'effet protecteur de l'HO contre le stress oxydant est indirect, puisqu'il est relié au fait que :

- La biliverdine se transforme en bilirubine qui possède une activité antioxydante.
- Le fer produit par l'activité de l'HO stimule la synthèse de la ferritine, qui est aussi impliquée dans la réponse antioxydant (Favier, 2003 ; Servais, 2004).

- **Les protéines de stress thermique :** Ces protéines interviennent dans la réparation des dommages oxydatifs induits au niveau des protéines par un stress oxydant (Favier, 2003 ; Servais, 2004).

**4.B. Les antioxydants non enzymatiques :** Parmi ces antioxydants se trouvent les thiols (SH) dont certains sont synthétisés *in vivo*, comme le glutathion (GSH). Le glutathion est un tripeptide ( $\gamma$ -Glu-Cys-Gly) dont la concentration intracellulaire est importante puisqu'elle est de l'ordre de  $10^{-4}$  à  $10^{-3}$  mol.L<sup>-1</sup> (Halliwell et Gutteridge, 2007). La fonction thiol confère au glutathion un rôle d'antioxydant, c'est-à-dire de réducteur, qu'il exerce vis-à-vis de nombreuses espèces oxydées, et en particulier vis-à-vis de l'eau oxygénée et des radicaux hydroxyles :



Toutefois, le rôle protecteur de GSH semble provenir de sa capacité à réagir avec les radicaux centrés sur le carbone R $\cdot$  :



Le rôle essentiel de la vitamine E est de capter les radicaux peroxydes lipidiques  $RO_2\cdot$  qui propagent les chaînes de peroxydation. La partie active de la molécule étant la fonction phénol réductrice ( $\alpha$ -TH), celle-ci perd facilement un atome d'hydrogène et se transforme en radical  $\alpha$ -tocophéryle,  $\alpha$ -T $\cdot$ , tandis que le radical peroxyde est réduit en une molécule d'hydroperoxyde :



De plus, l' $\alpha$ -tocophérol capte les radicaux superoxydes (sous leur forme protonée  $HO_2\cdot$ ), les radicaux hydroxyles  $\cdot OH$ , ainsi que l'oxygène singulet  $^1O_2$  (espèce réactive de l'oxygène, non radicalaire).

Le recyclage de la vitamine E est assuré par des systèmes réducteurs dont le plus important est l'ascorbate (réaction ci-dessus), lui permettant de jouer son rôle d'antioxydant à plusieurs reprises.

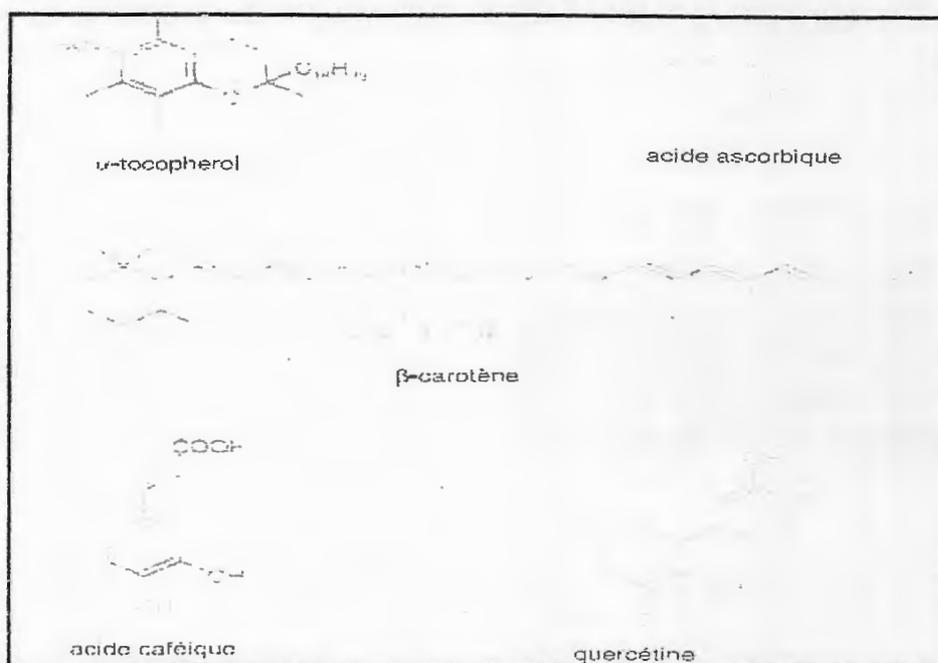


Figure 6 : Antioxydants d'origine alimentaire :  $\alpha$ -tocophérol, acide ascorbique  $\beta$ -carotène, acide caféique et quercétine.

- **Les caroténoïdes** : Ils sont très nombreux et représentent la principale source alimentaire de rétinol. En plus de leur activité de provitamine A, les caroténoïdes ont un rôle spécifique de capteur d'oxygène singulet  $^1O_2$ , ce qui leur permet d'exercer une protection vis-à-vis des dommages induits par les rayons ultraviolets de la lumière solaire. D'après Burton et Ingold (Burton et Ingold, 1984), l'effet antioxydant du  $\beta$ -carotène serait dû à une interaction entre le radical et le système de doubles liaisons conjuguées de la chaîne insaturée du piègeur qui serait stabilisé par résonance.

- **Polyphénols**

1. **Définition**

Les polyphénols constituent une famille de molécules organiques largement présente dans le règne végétal. Ils sont caractérisés, comme l'indique le nom, par la présence de plusieurs groupements phénoliques associés en structures plus ou moins complexes généralement de haut poids moléculaire, ces composés sont les produits du métabolisme secondaire des plantes (Stanley et *al.*, 2003).

Les polyphénols prennent une importance croissante, notamment à cause de leurs effets bénéfiques sur la santé (Stanley et *al.*, 2003). En effet, leur rôle antioxydant naturel suscite de plus en plus d'intérêt pour la prévention et le traitement du cancer (Chen et *al.*, 2004), des maladies inflammatoires (Langhton et *al.*, 1991), cardiovasculaires (Frankel et *al.*, 1993) et neurodégénératives (Orgogozo et *al.*, 1997). Ils sont également utilisés comme additifs pour l'industrie agroalimentaire, pharmaceutique et cosmétique (Langhton et *al.*, 1991).

2. **Structure générale des poly phénols**

Les polyphénols naturels regroupent un vaste ensemble de substances chimiques comprenant au moins un noyau aromatique et un ou plusieurs groupes hydroxyles, en plus d'autres constituants (Bamforth, 1999). Ils sont très nombreux : plus de 8000 structures sont actuellement connues. Le classement précis de tous les poly phénols est difficile et controversé sur certains points. Les acides phénoliques, les flavonoides, les tannins et les lignines constituent quatre grandes classes regroupant la majorité des structures (Schmitt et *al.* 1998).

Les phénols naturels vont de molécule simples (figure 7), comme les acides phénoliques à des composés les plus généralement décrit ont un poids moléculaire d'environ 5000 DA, cependant des polymères de plus de 30000 DA déjà été décrits (Bravo, 1998)

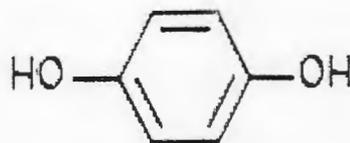


Figure 7 : Structure d'un phénol simple (Bravo, 1998).

3. **Les grandes classes des poly phénols**

Ils peuvent être regroupés en de nombreuses classes qui se différencient d'abord par la complexité du squelette de base, ensuite par le degré de modifications de ce squelette,

enfin par les liaisons possibles de ces molécules de base avec d'autres molécules (glucides, lipides, protéines...) (Sarni- Machado et Cheynier, 2006).

Les principales classes sont :

### ❖ *Acide phénolique*

Le terme d'acide phénol peut s'appliquer à tous les composés organiques possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique. La pratique courante en phytochimie conduit à réserver l'emploi de cette dénomination aux seuls dérivés des acides benzoïques et cinnamiques (Bruneton, 1993).

Les formes phénoliques les plus simples présentent des structures chimiques allant du simple phénol en C<sub>6</sub> (non présent naturellement chez les végétaux), ces substances sont présentes sous forme soluble dans la vacuole (Sarni- Machado et Cheynier, 2006).

### ❖ *Les flavonoïdes*

Cette catégorie de substances naturelles forme une grande partie des métabolites secondaires d'un grand nombre de variétés de plantes supérieures. Ce sont des composés naturels appartenant à la famille des polyphénols, formant ainsi l'ensemble des substances les plus répandues (Harbone et Baxter., 1999).

Ils possèdent une diversité structurale très importante. En effet, plus de 6500 structures ont été identifiées (Harbone et Baxter., 1999).

Ces diverses structures se rencontrent aussi bien sous la forme libre (aglycone) que sous forme de glycosides. Ils jouent un rôle important dans la protection des plantes (Bruneton, 1993).

La structure chimique des flavonoïdes est basée principalement sur un squelette de 15 atomes de carbone constitué de deux noyaux benzéniques A et B reliés par une chaîne en C<sub>3</sub> (figure 8) (Harbone, 1964).

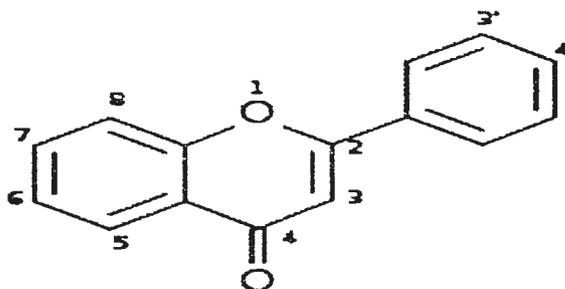


Figure 8 : La structure chimique des flavonoïdes (Bruneton, 1993).

### *Classification des flavonoïdes*

Tous les flavonoïdes peuvent être classés en plusieurs groupes selon le degré d'oxydation du cycle pyranique central (la chaîne en C<sub>3</sub>) (Guignard, 1974), le noyau B est relié à l'hétérocycle C dans les positions 2, 3 ou 4 :

- ❖ Dans la position 2, le flavanoïde est appelé flavane.
  - Si la position 4 de la flavane porte un groupement carbonyle, le flavanoïde est appelé flavanone
  - Si la liaison C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub> dans le squelette de la flavanone est insaturée le composé est nommé flavone ;
  - Si ce dernier est substitué en position 3 par un groupement hydroxyle, il est désigné par le nom de flavonol.
- ❖ Dans la position 3, le flavanoïde est désigné par le terme iso flavane.
  - Si la position 4 de l'isoflavane porte un groupement hydroxyle, le composé est désigné par le nom isoflavanol.
  - Si la position 4 de l'isoflavane porte un groupement carbonyle, le composé est appelé isoflavanone.
  - Si la liaison C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub> dans le squelette de l'isoflavanone est insaturée, le composé est nommé isoflavone (Harbone, 1964).
- ❖ Dans la position 4 avec un carbonyle en C<sub>2</sub> et une insaturation entre C<sub>3</sub> et C<sub>4</sub>, le composé est dit néoflavone, ce type de composés est également appelé 4-aryl coumarine (Forkman, 1992).

### ❖ *Les tanins*

Les tanins sont des formes phénoliques condensées capables de se lier aux protéines en solution et de les précipiter. Aussi les premières estimations quantitatives des tanins ont-elles utilisé leur capacité d'interaction avec des protéines modèles : albumines, hémoglobines... Les tanins ont une importance économique et écologique considérable et sont responsables de l'astringence de nombreux fruits et légumes et de leurs produits dérivés (Sarni- Manchado et Cheynier, 2006).

On distingue habituellement, chez les végétaux supérieurs, deux groupes de tanins différents par leur structure aussi bien que par leur origine biogénétique : les tanins hydrolysables et les tanins condensés (Bruneton, 1993)

### 3. *Les propriétés des polyphénols*

#### ➤ *Propriétés physico-chimiques*

Les polyphénols sont des molécules associées par des liaisons hydrogènes donc peu volatils, ils sont très solubles dans la plus part des solvants organiques, mais ils forment

avec l'eau un hydrante peu stable à 15C° avec décomposition, ces éléments dans l'ultra violet moyen, les phénols absorbent vers 240 nm, ils sont caractérisés en infrarouge par une bande forte de la liaison O-H (Laurent, 1985).

Les propriétés chimiques peuvent être classés en cinq groupes :

Les réactions correspondant à la repture de la liaison O-H, la liaison C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>-OH, l'hydrogénation du noyau, les substitutions dans le noyau benzénique et en fin l'oxydation (Laurent, 1985).

### ➤ Propriétés bioactives

Les poly phénols présentent des activités biologiques qui sont résumés dans le tableau 3.

**Tableau 3: Les propriétés bioactives des poly phénols**

Poly phénols	Activités	Auteurs
Acides phénols (cinnamiques et benzoïques)	- Antibactériennes - Antifongiques - Antioxydants	Didry <i>et al.</i> , 1982 Ravn <i>et al.</i> , 1984 Hayase et Kato 1981
Coumarines	- Protectrices vasculaires - et anti-oedémateuses	Mabry et Ulubelen 1980
Flavonoides	- anti-tumorales - anti-carcinogènes - anti-inflammatoires - hypotenseurs et diurétiques - antioxydants	Stavric et Matula 1992 Das <i>et al.</i> , 1994 Bidet <i>et al.</i> , 1987 Bruneton, 1993 Aruoma <i>et al.</i> , 1995
Tanins galliques et catéchiques	- antioxydants	Okuda <i>et al.</i> , 1983 Okamura <i>et al.</i> , 1993

## 6. Relation structure réactivité

### ➤ Cas des flavones et flavonols

La preuve des effets protecteurs et anti-oxydants des composés phénoliques est fondée sur diverses études. Il a été montré que les flavonoides agissent comme des fixateurs de plusieurs espèces oxydantes ; tel que l'anion peroxyde (O<sub>2</sub>), le radical hydroxyle ou les radicaux peroxydes. Les données de la littérature montrent une mise en évidence de certaines relations entre la structure chimique du flavonoides et l'activité antioxydant :

- La présence du groupe hydroxyle 3-OH lié à la double liaison C-2=C-3, et son emplacement adjacent au groupement carbonyle de l'hétérocycle (C) en position C-4 est exigé pour la grande efficacité de l'activité antioxydant (Hahida and Wanasundra, 1992).
- La O-méthylation des substituants hydroxyles du squelette flavonique réduit l'activité antioxydant des flavonoides (Yokozawa et al., 1998).
- Les groupements hydroxyles en position 3, 5, 7, 3', 4' participent dans l'inhibition de la peroxydation lipidique (Cook and Samman, 1996).
- La capacité antioxydant des flavonoides revient à leur aptitude à former des chélates métal-ion, par l'ensemble (3-hydroxy, 4-oxo) ou (5-hydroxy, 4-oxo) (Kitta et al., 1992).
- Les hydroxyles 5-OH, 7-OH, et la double liaison C-2=C-3 qui sont des sites potentiels de réactivité, sont essentiels pour l'activité inhibitrice des flavonoides de l'enzyme Xanthine oxydase et du radical peroxyde produit par ce dernier (Cos et al., 1998).

### ➤ Cas des isoflavones

Les activités biologiques diverses de la génistéine (4', 5, 7-trihydroxyisoflavone) ont fait l'objet de nombreuses études publiées durant les dix dernières années. La majorité de ces études ont porté sur les activités pharmacologiques de la génistéine comme inhibiteur de la tyrosine kinase, des activités chimiopréventives contre les maladies du cancer et les maladies cardiovasculaires et essentiellement l'activité phytoestrogénique (Dixon, 2004).

## 7. La biodisponibilité des polyphénols

Une meilleure connaissance de la biodisponibilité des polyphénols est indispensable pour mieux comprendre leurs effets protecteurs sur la santé. Leur absorption intestinale peut être excessivement variable (Scalbert et Williamson, 2000), elle dépend de leurs degrés de glycosylation (Hollman et al., 1995).

Une fois absorbés, les polyphénols ne sont jamais présents sous leurs formes natives végétales mais toujours sous formes glycosylées et conjuguées avec divers groupements : méthyle, sulfate, glucuronique (Manach et al., 1996).

Ces réactions des conjugaisons modifient la réactivité des polyphénols et facilitent leurs éliminations par voie biliaire ou urinaire.

Une partie des polyphénols excrétés par voie biliaire est réabsorbée et alimente un cycle entero-hépatique qui active relativement les polyphénols (J. Airon, 2000).

### 8. L'effet Anti-oxydant des polyphénols

Les flavonoïdes ont une capacité antioxydante, cette faculté leur permet de capter les radicaux libres, notamment l'anion superoxyde (Blanchemaison, 2000), ceci leur confère *in vitro* la capacité de diminuer l'activité d'enzymes comme la cyclooxygénase, les hydrolases, les bêtagalactosidases, et les oxydoréductases. Ils possèdent également une grande affinité pour les ions divalents ( $\text{Cu}^{++}$ ,  $\text{Zn}^{++}$ ...) (Husain *et al.*, 1987). Certains flavonoïdes sont utilisés comme antioxydants pour la conservation des huiles comestibles (Buleon et Metayer, 2004).

### 9. Action neuroprotecteurs des polyphénols

Il est récemment apparu que la supplémentation en aliments riches en polyphénols a un effet neuroprotecteur chez les animaux adultes utilisés comme modèles de cas d'ischémie et de maladie d'Alzheimer (SFA, 2007).

- **Les flavonoïdes** : Tous les flavonoïdes sont capables de piéger les radicaux libres générés en permanence par notre organisme ou formés en réponse à des agressions de notre environnement (cigarette, polluant, infections... ingérés avec nos aliments, ces composés renforcent nos défenses naturelles en protégeant les constituants cellulaires (lipides et macromolécules) contre le stress oxydant (Dellatre, 2005). Ils sont de bons capteurs de radicaux hydroxyles  $\text{OH}$ , l'anion superoxyde  $\text{O}_2^-$  et peroxydes  $\text{RO}_2$ . Ils sont donc susceptibles d'inhiber les chaînes de peroxydation lipidique. Les plus utilisés sont la quercétine (chef de file des flavonoïdes), le resvératrol, extrait de l'écorce du raisin rouge... Le piégeage des radicaux libre se fait selon la réaction (Bors *et al.*, 1997 ; Cao *et al.*, 1997) :



Où  $\text{R}^\cdot$  représente l'anion superoxyde, le peroxyde, l'alkoxyde et l'hydroxyle. Le radical flavonoxy ( $\text{FL-O}^\cdot$ ) peut réagir avec un autre radical pour former une structure quinone stable, figure 9.

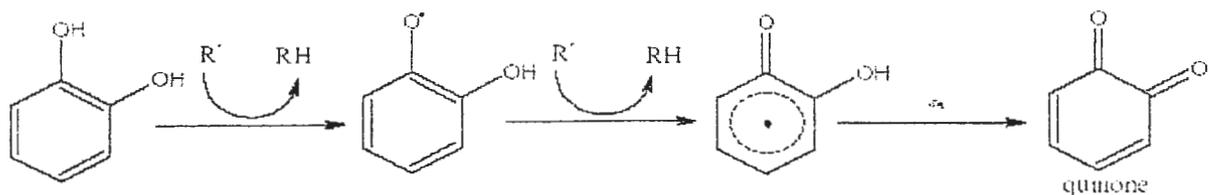


Figure 9: Piégeage des ROS ( $\text{R}^\cdot$ ) par les flavonoïdes (Marfak, 2003).

En outre, le radical flavonoxy peut interagir avec l'oxygène pour donner une quinone et un anion superoxyde. Cette réaction est responsable d'un effet prooxydant indésirable des flavonoïdes. Nous constatons que la capacité des flavonoïdes d'agir comme antioxydants dépend non seulement du potentiel redox du couple  $\text{FL-O}^\cdot / \text{FL-OH}$  mais aussi de la réactivité du radical flavonoxy.

Par ailleurs, les flavonoïdes sont considérés comme de bons chélateurs des ions métalliques.

Des études menées par Van Acker et ses collaborateurs (Van Acher *et al.*, 1996), montrent l'aptitude des flavonoïdes à chélater les minéraux. La quercétine est la plus active des flavonoïdes étudiés dans ce travail. On peut résumer les sites essentiels pour la chélation des ions métalliques dans la figure 10.

(i) un noyau catéchol sur le cycle B, (ii) les groupes 3-hydroxyle et 4-oxo du cycle C, et (iii) les groupes 4-oxo et 5-hydroxyle entre les cycles A et C.

En fin, selon la communauté scientifique, la capacité des flavonoïdes à piéger les radicaux libres est en relation avec ceux qui combinent les trois critères suivants:

1. La structure ortho-dihydroxy sur le cycle B (groupement catéchol) qui confère la stabilité au radical flavonoxy et participe à la délocalisation des électrons.

2. La double liaison C2-C3 en conjugaison avec la fonction 4-oxo.

3. La présence du groupe 3-OH en combinaison avec la double liaison C2-C3.

A titre d'exemple, la quercétine satisfait à tous ces critères et par conséquent, elle est le composé le plus actif de la famille des flavonoïdes (figure 11).

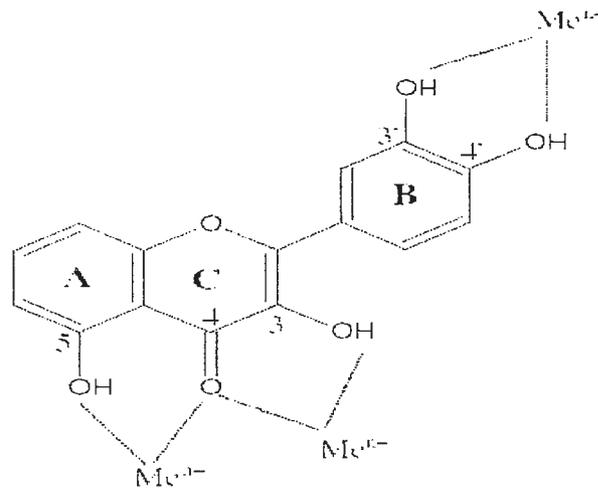


Figure 10 : Flavonoïdes et leurs sites proposés pour la chélation des ions métalliques ( $Me^{n+}$ ) (Van Acher *et al.*, 1996).

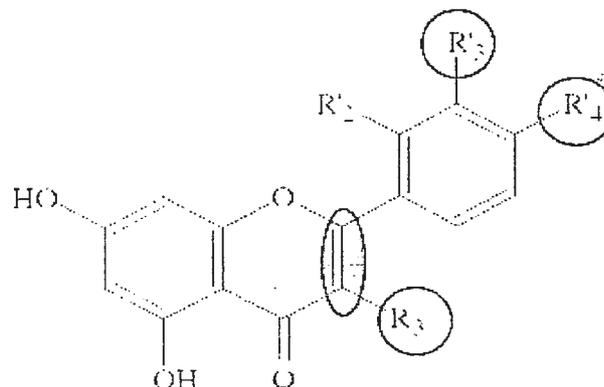
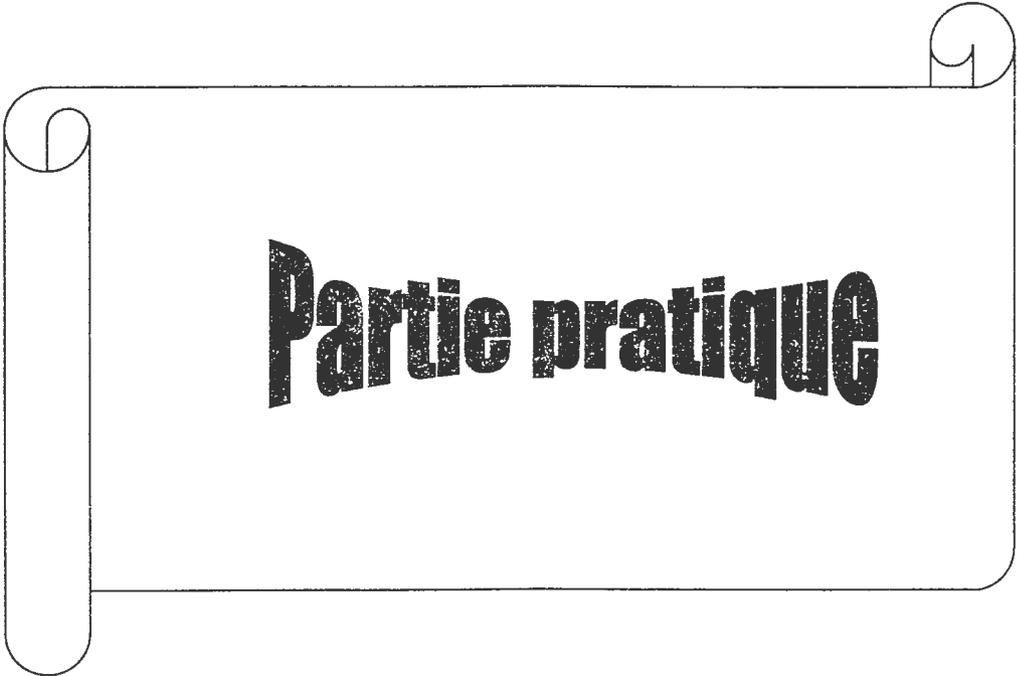


Figure 11 : Eléments essentiels pour l'activité antioxydante des flavonoïdes. (Marfak, 2003).



**Partie pratique**

# **Chapitre 3**

**Matériel et méthodes**

L'étude expérimentale a été effectuée au laboratoire de biochimie de la faculté des sciences, Université de Jijel. Elle est consacrée pour évaluer à priori la neurotoxicité de l'endosulfan à la dose rencontrée dans certains légumes en l'occurrence les piments et les tomates cultivés dans la région de Jijel, et à fortiori l'effet préventif des extraits polyphénoliques d'épluches d'orange contre cette toxicité.

### 3.1. Matériels

**\*Animaux :** L'étude est réalisée sur les rats albinos femelles de souche *Swiss* provenant de l'institut Pasteur d'Alger (Algérie) dont le poids corporel compris entre 132-233g. Les rats sont installés dans des cages en plastique ou en métal de 5 rats chacune avec libre accès à la nourriture (croquette). L'animalerie est maintenue à une température ambiante (20-25°C) et soumis à une photopériode de 12/24heures.

**\*L'épluche d'orange :** Les épluches d'oranges du genre *citrus sinensis* sont utilisés comme source de polyphénols que nous avons utilisés pour prévenir la toxicité. Ces fruits sont ronds ou légèrement ovales de 6,5 à 9cm de diamètre, la peau externe (zeste) orange ou jaune est criblée de minuscules glandes sécrétrices d'huiles essentielles et la peau interne blanche à une consistance spongieuse (Figure 12).

La chaire comestible est divisée en quartiers entourés d'une membrane, l'orange est dite sanguine à la chair rouge (Mikolajski, 2007). C'est le fruit le plus consommé au monde en jus (Dubois, 2006).

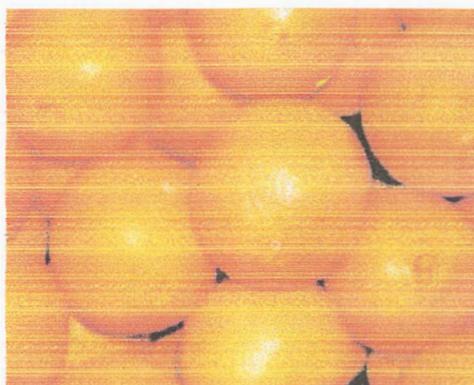


Figure 12 : Fruit *citrus sinensis* (Thomson Navel) (Dubois, 2006).

**\* L'endosulfan :** C'est un pesticide appartient de la famille des organochlorés, la posologie recommandée pour réaliser cette étude était de 4mg/kg. C'est la dose rencontrée chez certains légumes cultivés dans la région de Jijel.

### 3.2. Méthodes

#### 3.2.1. Extraction des polyphénols

L'extraction a été réalisée selon protocole inspiré selon Bruneton, 1993:

- **Séchage :** après le lavage des épluches d'oranges, ces dernières sont séchées à l'air libre pendant une semaine à l'abri de la lumière et de l'humidité.

- **Broyage** : Le broyage des épluchures est effectué à l'aide d'un broyeur électrique jusqu'à l'obtention d'une poudre très fine.
- **Macération** : 350g de poudre sont mis dans 3,5l d'une solution hydro-éthanolique (8 :2) et laisser macérer pendant 5 jours puis le macérât est filtré.
- **Evaporation** : pour éliminer l'éthanol nous avons passé le macérât par le Rotavapor (Evaporateur E100, Hei dolph), à une température de 55°C à une vitesse maximale jusqu'à l'obtention d'une petite quantité de la phase aqueuse.
- **Lyophilisation** : La phase aqueuse obtenue après l'évaporation est lyophilisée par le lyophilisateur (CHRIST, Alpha 1-2) pour obtenir les extraits en poudre de polyphénols de zeste d'orange.

### 3.2.2. Traitement des animaux

Les rats (n=15) sont répartis en trois lots de 5 rats chacun:

**Lots 1** : Animaux témoins recevant 1ml d'eau distillée par voie orale chaque jour pendant une semaine

**Lots 2** : Animaux intoxiqués recevant par gavage gastrique (Figure 15) une dose de 4 mg/kg d'endosulfan durant 5 jours (1er, 2ème, 4ème, 5ème, et 7ème jour).

**Lots 3** : Animaux préventifs recevant par gavage gastrique une dose de 100 mg/kg de polyphénols suivie, après 30 minute, d'une dose de 4 mg/kg d'endosulfan 5 jours pendant une semaine.

### 3.2.3. Sacrifice des animaux et prélèvement des cerveaux

A la fin de la période d'administration, les animaux sont sacrifiés, le cerveau est prélevé est divisé en deux fractions (Figure 16): la première est plongée dans le tampon phosphate (0.1 M ; pH : 7.4) contenant KCl (1.17%) est utilisée pour la préparation de la fraction cytosolique qui servira pour le dosage des paramètres : MDA, SOD, CAT et protéines et la seconde est mise dans la solution de TCA (5%) qui servira pour le dosage du GSH cytosolique

### 3-2-4 Préparation de la fraction cytosolique

La fraction cytosolique est extraite selon la méthode de Sanmugapriya et Venkataraman (2006). Brièvement, un 1g de cerveau est prélevé et homogénéisé par un broyeur de Douce (KONTES. Glass company an ISO-9001 steere<sup>®</sup> firm), dans un tampon phosphate (0.1 M ; pH 7.4) contenant KCl (1.17%) en suite le broyât est centrifugé à 10000 tpm pendant 45 min à 4°C. Le surnageant issue de la centrifugation est utilisé comme source au MDA, SOD, CAT et protéines. Pour le dosage de GSH, le cytosol est obtenu en utilisant le TCA (5%) à la place du tampon phosphate et l'homogénat est obtenu après centrifugation à 2000 tpm pendant 15 min (Ellman, 1959).

### 3.2.5. Dosage du MDA, SOD, CAT, GSH et les protéines

#### 3.2.5.1. Dosage du MDA

A ce jour, le marqueur le plus utilisé pour déterminer un stress oxydatif reste le malonaldéhyde (MDA), qui est évalué par la méthode d'Ohkawa *et al.*, (1979).

\* **Principe de dosage :** La notion de dosage du MDA est substituée à la notion de TBARS « Substances réagissent avec l'acide thiobarbiturique ». La réaction de dosage du MDA repose sur la formation en milieu acide à chaud (100°C) entre le MDA et deux molécules d'acide thiobarbiturique (TBA) d'un pigment de couleur rose absorbant à 532 nm extractible par les solvants organiques comme le n-butanol (Lefèvre, 2003) (Figure 13).

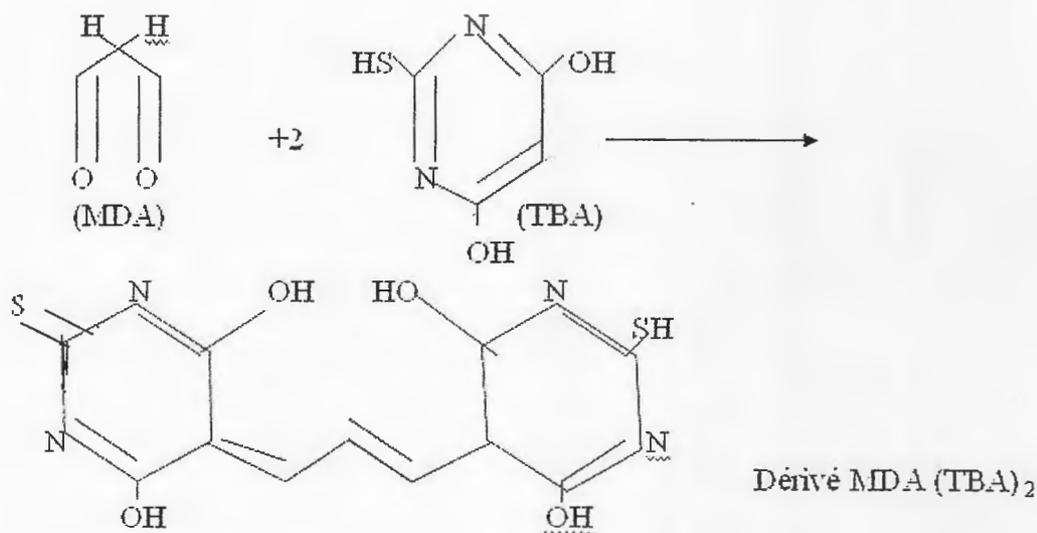


Figure 13 : Réaction MDA avec TBA (Logani *et al.*, 1980).

\* **Protocole d'évaluation de MDA :** Le dosage du MDA est effectué selon le protocole récapitulé dans le tableau 4 :

Tableau 4 : Les étapes de la réalisation de dosage du MDA

Tubes Solutions (ml)	Tube blanc	Tube échantillon
Fraction cytosolique	—	0.5
Kcl	0.5	—
TCA (20%)	0.5	0.5
TBA	1	1
Bain Marie 100°C pendant 45min puis refroidissement avec des glaces		
n-butanol	4	4
Centrifugation à 3000 tpm pendant 15 min		
Lecture spectrophotométrique à 532 nm		

Les valeurs du MDA sont obtenues en utilisant une courbe d'étalonnages élaborés avec le tetraetoxypropane (TEP) (Annexe3) et les valeurs sont exprimées en nmol/g de cerveau.

### 3.2.5.2. Dosage du glutathion

Le glutathion est le thiol intracellulaire le plus abondant présent dans toutes les cellules animales à des concentrations variables allant de 5 à 10mM, il est mesuré selon la méthode d'Ellman (1959).

\* **Principe de dosage :** Pour le dosage du GSH, la méthode colorimétrique par le réactif d'Ellman (DTNB) est la méthode la plus employée. La réaction consiste à couper la molécule d'acide 5,5 Thiobis 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 (Figure14).

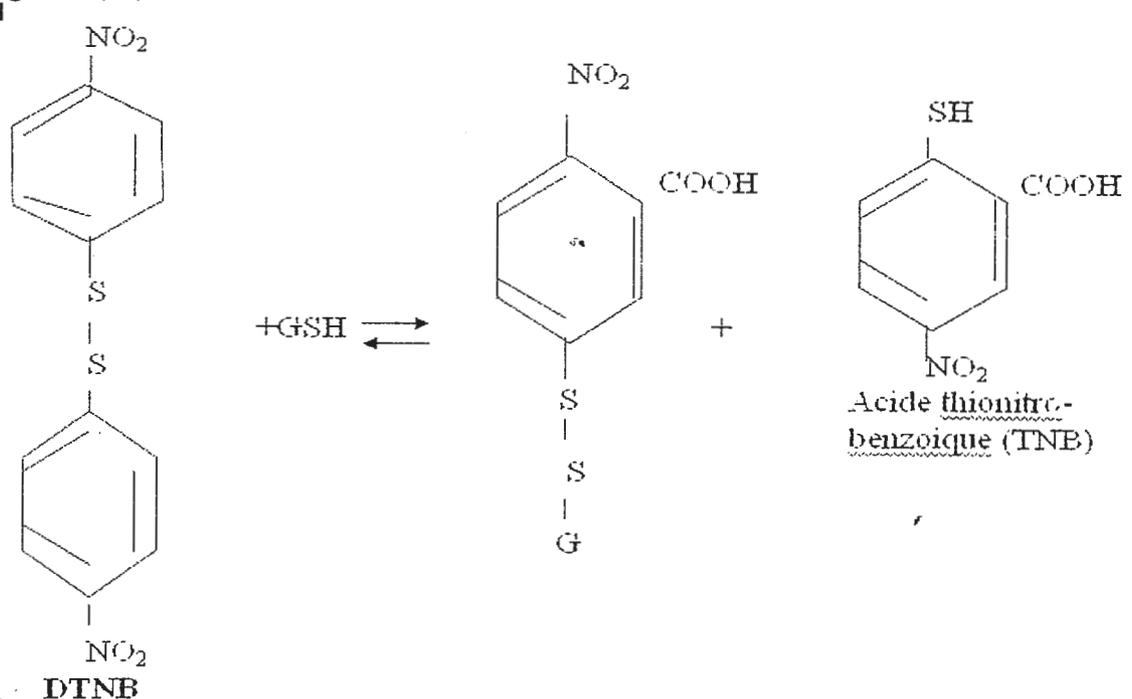


Figure 14: Réaction du GSH avec DTNB (Lahouel, 1985).

\* **Protocole de dosage du GSH** : Le dosage du GSH est effectué selon le protocole récapitulé dans le tableau 5:

**Tableau 5 : les étapes de la réalisation de dosage du GSH**

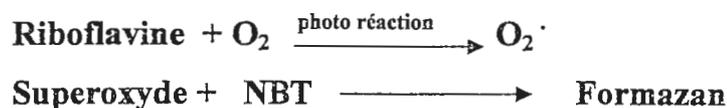
Solutions / Tubes	Tube blanc	Tube échantillon
TCA (5%)	50µl	—
Fraction cytosolique	—	50µl
Tompon phosphate (pH : 8)	10ml	10ml
Agitation du mélange		
Mélange	3ml	3ml
DTNB	20µl	20µl
Incubation pendant 15 min		
Lecture spectrophotométrique à 412 nm		

Les valeurs sont obtenus en utilisant une courbe d'étalonnage effectué avec le glutathion pur (Annexe3) et sont exprimées en mmol /g de cerveau.

### \* 3.2.5.3. Mesure de l'activité de la SOD

L'activité du SOD est mesurée selon la méthode de Beauchamp & Fridovich, 1971).

\* **Principe de dosage** : La détermination de l'activité dépend de la capacité de l'enzyme à inhiber la réduction du nitroblutetrazolium [NBT] inhibition de la formation de formazan par les superoxydes qui sont produit par la réaction de la riboflavine et l'oxygène photo réduite comme suit :



\* **Protocole de mesure de l'activité de la SOD** : Le dosage de la SOD est effectué selon le protocole récapitulé dans le tableau 6:

**Tableau 6 : Les étapes de la réalisation de dosage du SOD**

Solutions / Tubes	Tube blanc	Tube échantillon
Réactif	2ml	2ml
Fraction cytosolique	—	50µl
Eau distillée	50µl	—
Exposition à une lampe UV (15W/10min)		
Lecture au spectrophotométrique à 560 nm		

Une unité De l'activité de la SOD est calculée pour l'enzyme causant 50% d'inhibition de la réduction du formazan.

$$\% \text{ inhibition} = \frac{\text{Abs du blancs} - \text{Abs d'échantillon}}{\text{Abs du blanc}} \times 100$$

L'activité enzymatique est calculée en UI /mg de protéine.

$$\text{SOD UI/mg} = \% \text{ inhibition} \times 6.35$$

#### 3.2.5.4. Mesure de l'activité de catalase

L'activité catalytique a été mesurée selon la méthode de Clairborne, (1985).

\* **Principe de dosage:** La catalase est une enzyme héminique peroxysomale qui possède quatre groupes protoporphyrines. L'activité catalytique est évaluée par la mesure de la diminution de l'absorbance d'une solution d' $\text{H}_2\text{O}_2$  à 240 nm pendant 1 min à 25°C. Cette diminution de l'absorbance étant due à la dismutation du peroxyde d'hydrogène par la catalase selon la réaction suivante:



\* **Protocole de mesure de l'activité de CAT :** Le dosage du CAT est effectué selon le protocole récapitulé dans le tableau 7.

**Tableau 7 : Etapes de la réalisation de dosage du CAT**

Tubes Solutions(ml)	Tube blanc	Tube échantillon
Tompon phosphate $\text{KH}_2\text{PO}_4$ (0.1M, pH : 7.2)	1	1
$\text{H}_2\text{O}_2$ (0.019)	0.97	0.97
Fraction cytosolique	—	0.025
Eau distillée	0.025	—
Lecture spectrophotométrique chaque minute pendant 2min à 240 nm		

L'activité enzymatique est exprimée en UI /mg de protcine, l'unité de l'activité de la catalase est calculée par la formule suivante :

$$\text{UI /g de protéine} = (2.303 / T) \log \frac{A_1}{A_2}$$

$A_1$  : absorbance au temps 0 min.

$A_2$  : absorbance au temps 1 min.

$T$  : intervalle de temps en 1 min.

### 3.2.5.5. Dosage des protéines cytosoliques

Le dosage des protéines cytosolique a été réalisé selon la méthode de Lowry, (1951).

\* **Principe de dosage :** Le principe de cette méthode est basé sur la réduction de réactif de Folin-ciocalteus (acide phosphoprotéine et phosphotungstic) dans la présence des protéines à une solution condensée de couleur bleue. Cette coloration est due à la réaction de cuivre avec les liaisons peptidiques et aussi à la réaction de l'acide phosphotungstomolybdique avec les acide aminés : tyrosine, tryptophane et cystéine.

\* **Protocole de dosage des protéines :** Le dosage des protéines est effectué selon le protocole récapitulé dans le tableau 8:

**Tableau 8 : Etapes de la réalisation de dosage Des protéines**

<b>Tubes</b> <b>Solutions(ml)</b>	<b>Tube blanc</b>	<b>Tube échantillon</b>
Fraction cytosolique	—	1
Tompon phosphate	1	—
Solution R	1	1
Bien agiter et laissez à une température ambiante pendant 15 min		
Folin dilué à 10% (Fraîchement préparé)	3	3
Laisser pendant 45 min à une température ambiante et à labri de la lumière		
Lecture au spectrophotomètre à 750 nm		

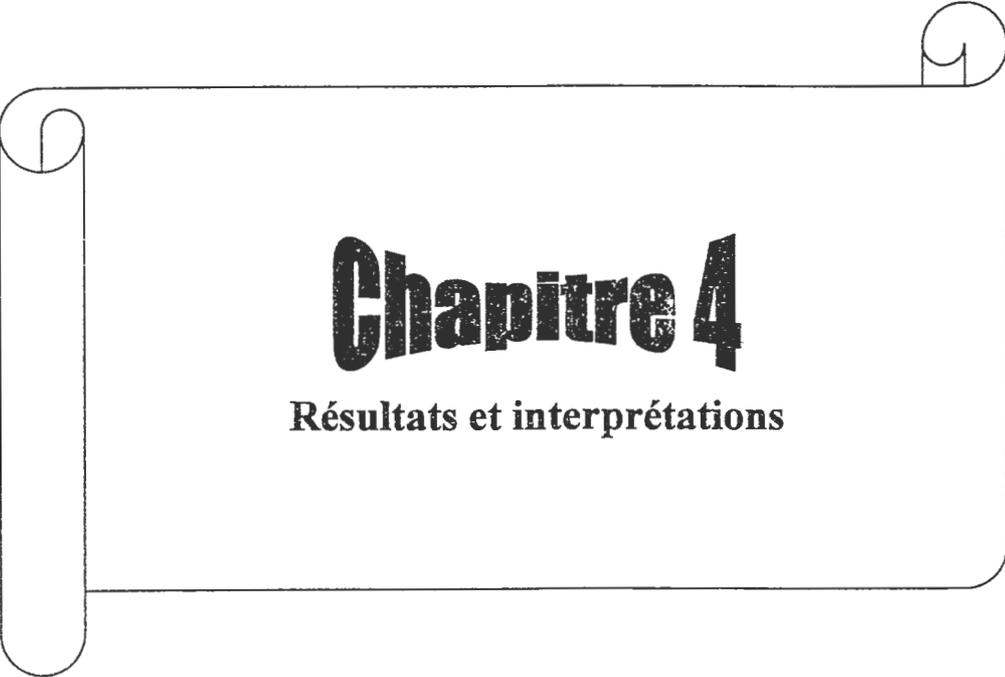
Les valeurs sont obtenues en utilisant une courbe d'étalonnage préparée par SBA (Annexe 3) et sont exprimées en mg de protéine /g de cerveau.



**Figure 15: Méthode d'administration par gavage gastrique.**



**Figure 16 : Prélèvement du cerveau.**



# **Chapitre 4**

**Résultats et interprétations**

#### 4.1. L'évaluation globale du statut redox des cellules nerveuses

Les résultats de l'évaluation générale de la balance anti-oxydants/ prooxydants des cellules nerveuses dans les différents traitements chez les rats, sont récapitulés dans le tableau 9.

**Tableau 9 : Variation des différents paramètres du statut redox des cellules nerveuses chez les différents groupes de rats.**

paramètres Lots	MDA (nmol /g)	GSH (mmol/g)	SOD (UI/mg)	CAT (UI /mg)	Protéines (µg/g)
Témoin	0,104 ± 0,02	0,43 ± 0,14	352,43 ± 23,53	1,932 ± 0,678	777,99 ± 30,27
Intoxiqué	0,141 ± 0,007*	0,093 ± 0,06*	150,85 ± 35,9***	1,174 ± 0,543*	514,24 ± 19,36***
Positif	0,1300 ± 0,004*	0,21 ± 0,14*	260,35 ± 32,45*	1,636 ± 0,548	607,37 ± 19,76***

*Lot témoin est traité par l'eau distillée ; lot intoxiqué est traité par l'endosulfan (4mg/kg) ; lot préventif est traité préventivement par l'extrait de poly phénols (100mg/kg) en association avec l'endosulfan (4mg/kg).*

*Les résultats sont présentés en moyenne ± écart type, n : 5*

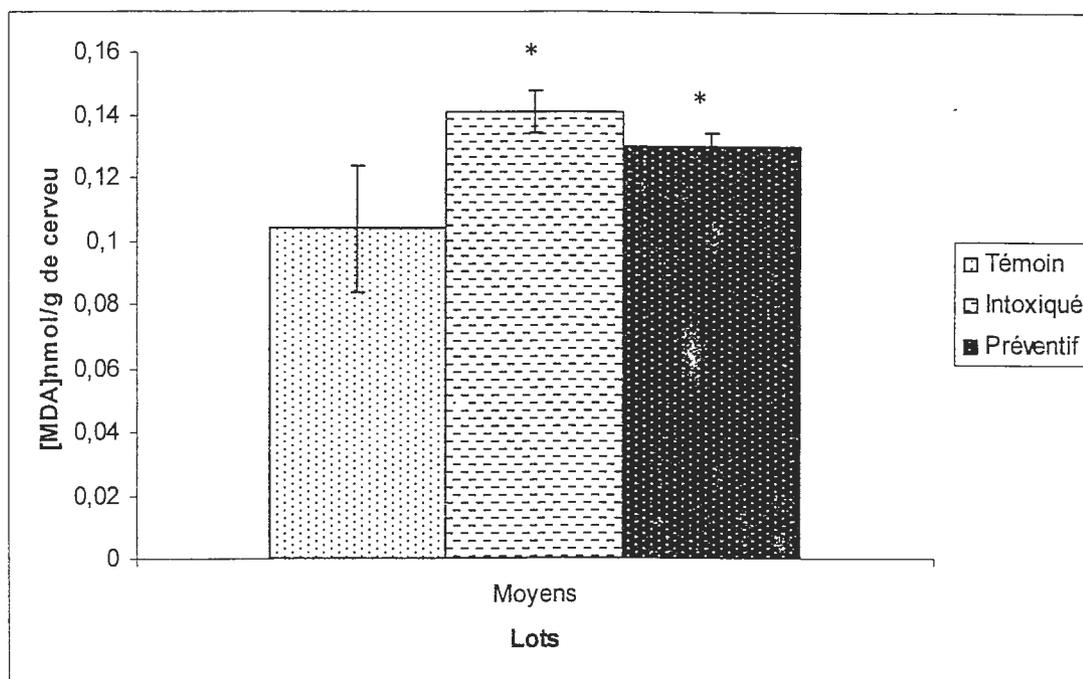
*Test de student, comparaison par rapport au témoin : (ns) non significatif ; \* significatif à  $p < 0,05$  ; \*\* hautement significatif à  $p < 0,01$  ; \*\*\* très hautement significatif à  $p < 0,001$ .*

Le constat fait est l'augmentation significative du MDA d'une part et la diminution significative également des enzymes antioxydantes, du glutathion et des protéines cytosoliques.

#### 4.2. Evaluation de la peroxydation lipidique

La quantification du marqueur de la peroxydation lipidique a donné des valeurs illustrées par l'histogramme ci-après (figure 17).

Nous avons constaté une augmentation significative ( $p < 0,05$ ) du MDA chez les rats intoxiqués et le groupe préventif qui atteint respectivement les valeurs ( $0,141 \pm 0,007$  nmol/ g de tissu) et ( $0,130 \pm 0,004$ ) par rapport aux rats témoins ( $0,104 \pm 0,02$  nmol/g de tissu).



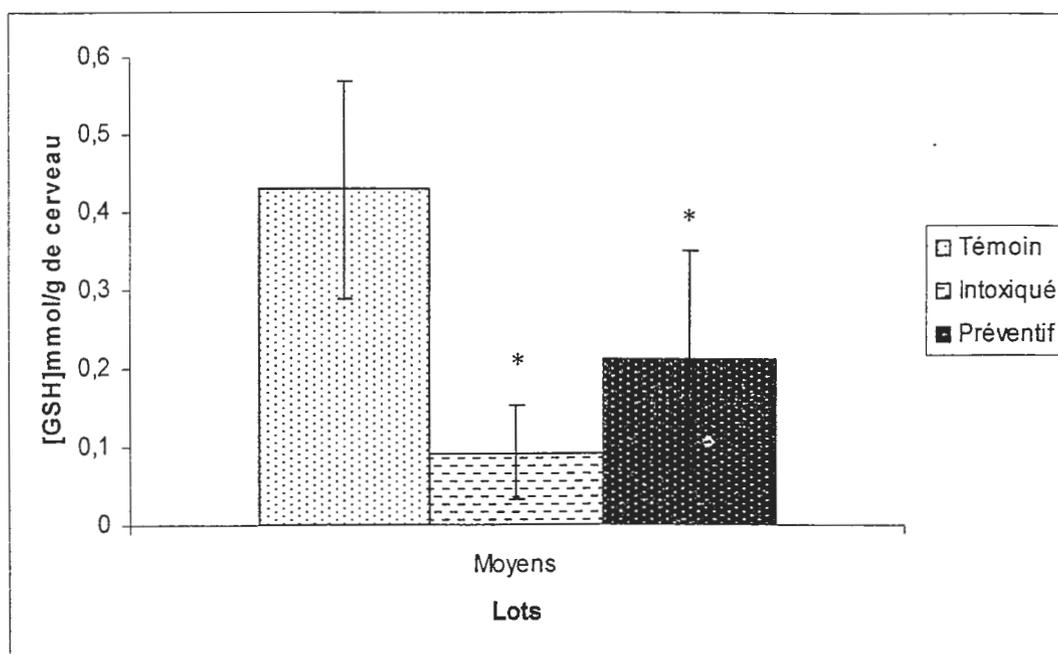
**Figure 17 : La variation de l'activité du MDA cytosoliques des cellules nerveuses dans les différents groupes de rats.**

*Les résultats sont donnés en Moyenne  $\pm$  écart type, n : 5*

*Test de Student, comparaison par rapport au témoin : \*  $p < 0.05$ , la différence est significative.*

### 4-3 Evaluation du taux du GSH

Les résultats obtenus de la quantification du GSH dans les cellules nerveuses des différents groupes d'animaux, sont illustrés par la figure 18.



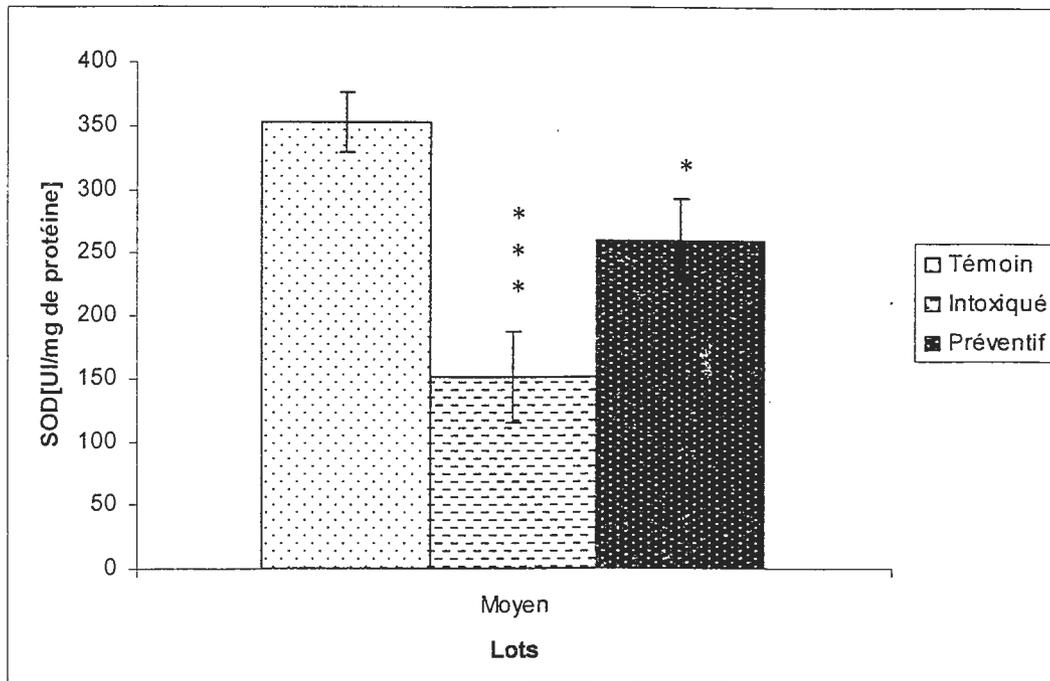
**Figure 18: La variation de l'activité de GSH cytosolique des cellules nerveuses dans les différents groupes de rats.**

Les résultats sont présentés en Moyenne  $\pm$  écart type,  $n : 5$   
 Test de Student, comparaison par rapport au témoin : \*  $p < 0.05$ , la différence est significative.

Nous avons constaté une chute significative ( $p < 0,05$ ) des taux cytosoliques de GSH dans les cellules nerveuses chez les rats intoxiqués et le groupe préventif avec des valeurs respectives de  $(0,93 \pm 0,06 \text{ mmol / g de tissu})$  et  $(0,21 \pm 0,14 \text{ mmol / g de tissu})$  par rapport aux témoins avec une valeur  $(0,43 \pm 0,14 \text{ mmol / g de tissu})$ .

#### 4-4 Evaluation de l'activité de la SOD

La mesure de l'activité du superoxyde dismutase dans les cellules nerveuses a donné les résultats illustrés par la figure 19.



**Figure 19: La variation de l'activité de la SOD cytosolique des cellules nerveuses dans les différents groupes de rats**

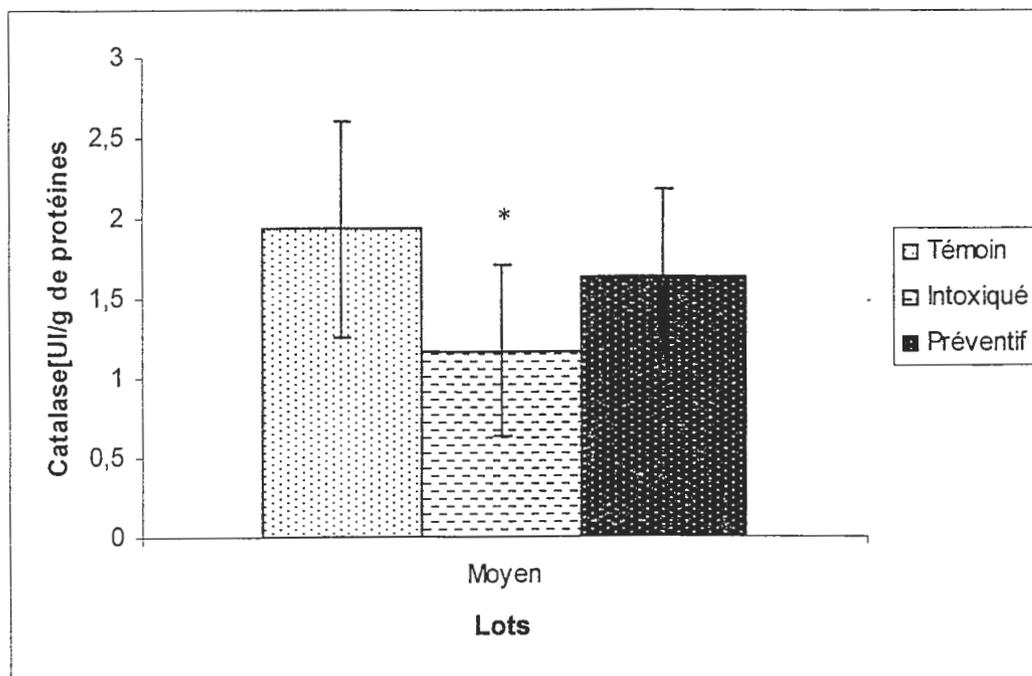
Les résultats sont présentés en Moyenne  $\pm$  écart type;  $n : 5$

Test de Student, comparaison par rapport au témoin : \*  $p < 0,05$ , la différence est significative ; \*\*\*  $p < 0,001$ , la différence est très hautement significative.

D'après l'étude statistique, il paraît qu'il y a une diminution très hautement significative ( $p < 0,001$ ) de l'activité du SOD chez les groupes intoxiqués ( $150,85 \pm 35,96$  UI/ g de protéines) et significative ( $p < 0,05$ ) chez le groupe préventif avec une valeur de  $260,35 \pm 32,45$  UI/ g de protéines, par rapport aux témoins avec une activité de  $352,43 \pm 23,53$  UI/ g de protéines.

#### 4-5 Evaluation de l'activité de la CAT

Les résultats de l'évaluation de la CAT cytosolique des cellules nerveuses chez les différents groupes de rats sont illustrés par la figure 20.



**Figure20 : La variation de l'activité de la catalase cytosolique des cellules nerveuses dans les différents groupes de rats.**

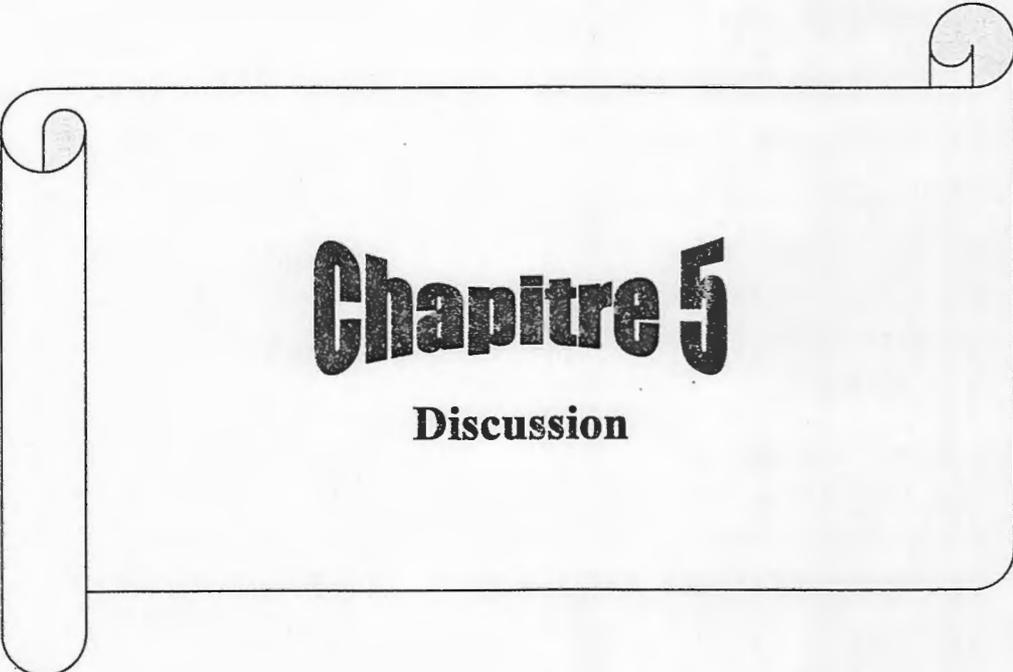
*Les résultats sont présentés en Moyenne  $\pm$  écart type, n : 5*

*Test de Student, comparaison par rapport au témoin : \*  $p < 0.05$ , la différence est significative.*

Les résultats montrent une diminution significative ( $p < 0,05$ ) de la catalase chez le groupe intoxiqué avec une valeur de  $1,174 \pm 0,543$  UI/ g de protéines, par rapport au groupe témoin ( $1,932 \pm 0,678$  UI/ g de protéines) et une différence non significative entre le lot préventif ( $1,636 \pm 0,543$  UI/ g de protéines) et le lot témoin ( $1,932 \pm 0,678$  UI/ g de protéines).

#### 4-6 Evaluation de la teneur cytosolique en protéines

Les résultats de la quantification des protéines cytosoliques des cellules nerveuses chez les différents groupes de rats sont illustrés par la figure 21.



# **Chapitre 5**

**Discussion**

## 5- Discussion

Les pesticides sont définis comme toute substance destinée à prévenir, détruire, attirer, repousser ou lutter contre tout élément nuisible, plante ou insecte, pendant la production, l'entreposage, le transport, la distribution et la transformation de denrées alimentaires, de produits agricoles ou d'aliments pour animaux. Leur immense succès dans les applications agricoles afin d'optimiser la productivité des denrées, a entraîné une étendue rapide de leur production et utilisation. Mais, vu leurs propriétés toxicologiques, ubiquité, persistance, présence et concentration dans la chaîne alimentaire, ils constituent un véritable danger, et sont actuellement considérés parmi les principaux polluants environnementaux, à l'origine de résidus toxiques dans l'air, le sol et l'eau. Leur utilisation massive dans les secteurs agricole, industriel et médical constitue donc une réelle menace mondiale (Jawich, 2006).

Plusieurs pesticides font partie des substances CMR (Cancérogènes, Mutagènes, Reprotoxiques) et sont par conséquent, liés à la recrudescence de nombreux cancers, malformations congénitales, infertilité, problèmes neurologiques, faiblesse du système immunitaire ... (Sanborn et *al.*, 2004). Parmi les pesticides utilisés en Algérie il y'a l'endosulfan,

Les polyphénols constituent un ensemble de molécules très largement répandues dans le règne végétal. De nos jours, les activités pharmacologiques des polyphénols sont amplement étudiées, ils jouent un rôle très important dans le domaine médical notamment leurs activités antioxydantes (Boulkour, 2004).

Pour mettre en évidence l'effet prooxydant d'endosulfan d'une part et l'effet neuroprotecteur des polyphénols d'autre part, nous avons soumis les rats, *à priori*, à un traitement par l'endosulfan à la dose de 4mg/kg, concentration retrouvée dans les légumes cultivés dans la région de Jijel et *à foriori*, à un traitement préventif en utilisant un extrait hydroéthanolique des épluches d'orange à la dose de 100 mg/kg.

L'investigation de la variation des paramètres du statut redox des cellules nerveuses rend compte les éléments suivants:

- **La peroxydation lipidique :** Les résultats de la présente étude apportent l'évidence d'une lipoperoxydation significativement accrue suite à l'administration de l'endosulfan aux animaux à la dose réelle de 4 ppm. Cette dose, il faut le signaler, est retrouvée par une autre équipe de recherche, dans les légumes se vendant au marché dans une étude parallèle d'investigation sur les organochlorés dans les produits agricoles. Cela dit que ce pesticide est susceptible de provoquer un déséquilibre du statut redox des cellules nerveuses au profit des prooxydants. Cet état de stress oxydatif provoque une oxydation importante des acides gras constituant les biomembranes cellulaires.

La peroxydation lipidique est largement évoquée pour être un mécanisme central dans la toxicité due à l'exposition aux pesticides. Outre leur capacité à générer les espèces réactives de l'oxygène, les pesticides et plus particulièrement les organochlorés se caractérisent par un degré d'hydrophobicité accrue, privilégiant ainsi leur interaction avec les constituants membranaires menant à leur désordonnement (Kalender et *al.*,

2004 ; Lee et *al.*,1991). Cette hyperperoxydation lipidique peut engendrer en premier lieu, et ensuite, une perforation des biomembranes cellulaires et une cytolysse dégageant les cellules nerveuses.

L'exposition chronique aux organochlorés provoque le stress oxydatif qui est à l'origine de la dégénérescence cellulaire des neurones et donc il induit des maladies tels que la maladie de Parkinson, la maladie de l'Alzheimer, encéphalopathie avec nausées, anorexie, asthénie, perte de mémoire, vertiges et ataxie (Tiffany-Castiglioni et *al.*, 2006 ; Llorca et *al.*, 2004).

D'autres travaux ont apporté les mêmes résultats sur les globules rouges. En effet, une augmentation temps et dose dépendante du MDA dans les globules rouges après l'exposition des poissons à l'endosulfan durant 10 jours (Shaohiq-ur-Rehman, 2006). Par ailleurs, Caglar et ses collaborateurs (2003), dans une étude sur les reins après l'administration de 13 mg/kg d'endosulfan à des souris femelles, ont observé une altération de la morphologie rénale à cause de la dégénération des membranes cellulaires et mitochondriales *al.*, 2003).

- **Les systèmes de défense antioxydants**

**Le GSH :** L'évaluation de la teneur cytosolique en GSH, considéré comme une molécule de la première défense intracellulaire, a montré une chute significativement importante chez les rats administrés d'endosulfan, témoignant ainsi d'un déséquilibre de la balance anti-oxydants / prooxydants en faveur des prooxydants qui sont à l'origine de la peroxydation lipidiques accrue constaté à travers le produit final de cette réaction (le MDA).

Il faut bien noter dans ce contexte que le GSH est un antioxydant qui joue un rôle à plusieurs niveaux dans la lutte contre le stress oxydant, la fixation des radicaux libres et des métabolites réactifs consomme le GSH ce qui conduit à une déplétion (Dorval and Hontela, 2003). Les résultats de cette présente étude se convergent avec ceux obtenus par Kalender et ses collaborateurs (2004) et Zama et ses collaborateurs (2007).

**La SOD et la CAT :** L'évaluation de l'activité enzymatique de la SOD a montré une chute très hautement significative, alors que l'évaluation de l'activité enzymatique de la CAT a montré une chute significativement importante chez les rats administrés d'endosulfan. Ces enzymes sont des enzymes antioxydantes de grande importance dans l'équilibre de la balance antioxydant/ prooxydant intracellulaire, (antioxydases).

Ces deux enzymes travaillent en parallèle, la CAT fait disparaître toute activité toxique de l' $H_2O_2$  préalablement produit en dismutant l' $O_2^{\cdot -}$  par la SOD (Altuntas et *al.*, 2002). La diminution de la CAT et la SOD pourrait se produire à cause de la production excessive des radicaux libres après l'administration de l'endosulfan, provoquant alors l'altération de l'activité biologique des macromolécules cellulaire, notamment les enzymes, dont la CAT et la SOD de par leur sensibilité au stress oxydant. En effet, la réduction de l'activité enzymatique peut résulter de nombreux effets due à une accumulation des radicaux superoxydes et peroxyde d'hydrogène (EL-Hossary, 2000).

Des résultats analogues ont été apportés par plusieurs études. Les travaux Kalender et ses collaborateurs (2004), sur le cœur des rats Wister, après une administration de 2mg/kg d'endosulfan par gavage gastrique chez pendant 6 semaines ont montré une diminution très hautement significative de la SOD et une diminution significative de la CAT (Kalender et *al.*, 2004).

Les mêmes résultats sont retrouvés dans l'étude de Zama sur les foies, les reins, cerveau, placenta, et l'embryon chez les rats femelles Wister, suite à l'administration de chlorpyrifos, un autre organochloré, à une dose de 20mg/kg à partir de 6<sup>ème</sup> au 15<sup>ème</sup> jours de grossesse. Il montre qu'il y'a une diminution très hautement significative de GSH et de la SOD en plus une augmentation très hautement significative du MDA (Zama et *al.*, 2007).

**Les protéines** : nous avons constaté une diminution très hautement significative du taux des protéines cytosoliques chez les lots intoxiqué et préventifs à cause de la diminution des enzymes dans le système nerveux en présence des radicaux libres comme on a déjà constaté pour la SOD et la CAT

Le constat global met en évidence l'augmentation de la formation de MDA, qui peut-être dû à la fois à la production excessive des ROS et à la diminution de la SOD, la CAT et le GSH. En revanche, l'extrait hydroéthanolique des épluchures d'orange (polyphénols) n'a pas pu empêcher le déséquilibre du statut redox chez les cellules nerveuses à cause éventuellement de la toxicité neurotoxique élevée du pesticide administrés aux animaux.

L'ensemble de ces résultats nous permet ainsi de noter la production d'une toxicité aigue neuronale provoquée par l'endosulfan. Ce dernier en tant que résidu phytosanitaire pourrait être transmis par la consommation quotidienne des légumes traités par les agriculteurs d'une manière aléatoire et non étudiée par les organochlorés.

Nous avons constaté également que l'effet préventif d'extrait des polyphénols des zestes d'orange, est introuvable chez les cellules nerveuses intoxiquées par l'organochloré à la dose de 100 mg/ kg. Nous supposons que la concentration utilisée est insuffisante, sachants que les polyphénols et notamment les flavonoïdes sont potentiellement antioxydants.

# Conclusion

## Conclusion

Il est admis que l'endosulfan joue un rôle important dans la protection des plantes alimentaires et les légumes cultivés en éradiquant une large gamme d'insectes nuisibles aux plantes alimentaires et légumes, assurant ainsi, comme tous les pesticides, un rendement considérable et fournissant aux consommateurs des produits agricoles à prix modiques. Par ailleurs, la toxicité de l'endosulfan est susceptible d'aller au-delà de ses cibles prévues et causer des graves intoxications à tous les êtres vivants en l'occurrence l'homme qui consomme à priori ces produits alimentaires. C'est la raison pour laquelle nous avons mis pour objectif l'effet toxique de cet organochloré dans cette présente étude.

L'étude de la neurotoxicité de l'endosulfan comme exemple des pesticides organochlorés utilisés en Algérie et la possibilité de protéger les animaux de laboratoire par les polyphénols de cette toxicité, nous a permis de :

- Confirmer la neurotoxicité de l'endosulfan en provoquant un dysfonctionnement neuronale dû à un déséquilibre du statut redox neuronale au profit des pro-oxydants, témoignant d'un état de stress oxydant. Ce stress est à l'origine de la peroxydation lipidique des biomembranes qui est la cause de la cytolyse neuronale et la diminution de la défense antioxydante endogène exprimée par la chute des antioxydants cytosoliques.
- De constater que l'effet préventif de l'extrait de polyphénols n'a pas lieu sauf chez la catalase dont l'évolution est non significative. Donc l'administration de polyphénols à la dose 100mg/kg ne donne aucun effet préventif sur cette neurotoxicité.

Ces résultats expliquent que cette dose n'est pas suffisante pour atteindre un effet préventif efficace contre ce degré de toxicité.

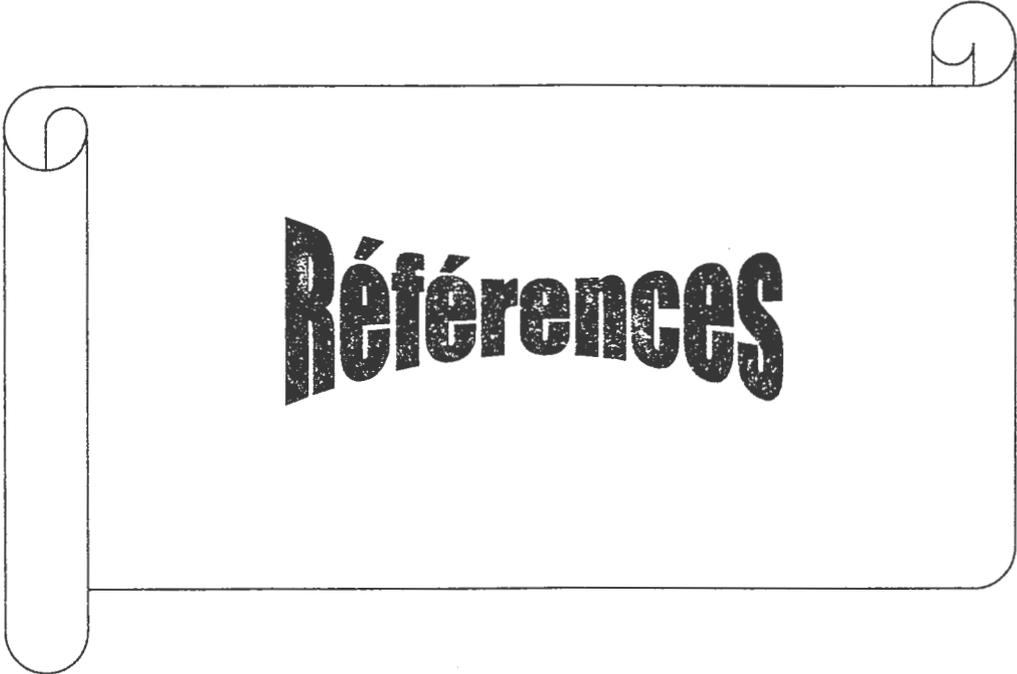
A fin de confirmer si les polyphénols sont pourvus d'un effet préventif contre la neurotoxicité de l'endosulfan, nous proposons d'augmenter la dose de l'extrait des composés phénoliques utilisé.

A partir des résultats de la présente étude, nous concluons donc que l'endosulfan est un produit toxique ayant un effet neurotoxique à la dose 4mg/kg. Cette toxicité est due à la production des radicaux libres qui attaquent les membranes cellulaires et donc perforer les biomembranes en provoquant la lyse des cellules nerveuses et qui peut aller jusqu'à générer des graves troubles neurologiques (maladies dégénératives telles que le parkinson, l'Alzheimer... .

**La convention de Stockholm (2001)** a listé 12 polluants organiques persistantes (POP), dont la présence dans l'environnement doit être réduite sinon bannie : il s'agit des molécules organochlorés DDT (dichlorodiphényltrichloroéthane), PCB (PolyChloroBiphényle), dioxines et furanes, toxiques à long terme et sur la reproduction, certaines ayant déjà été interdites pour des usages agricoles. Une deuxième liste de polluants très préoccupants a été ajoutée en 2003 ; elle comprenait les HAP (hydrocarbures aromatiques polycycliques), les dérivés organométalliques (de l'étain, du mercure et du plomb), les alkylphenols, les phtalates, des halogénés

(polybromodiphényléthers), des insecticides organochlorés récemment interdits (lindane) ou encore utilisés en agriculture (endosulfan).

De ce fait, il est bien recommandé de bien étudier cette neurotoxicité à long terme pour connaître l'impact de l'endosulfan sur l'organisme des consommateurs. Par ailleurs, il faudrait à *priori*, attirer l'attention des pouvoirs publics pour organiser des inspections de contrôle et de mise en garde quant à l'utilisation erronée et antiréglementaire des organochlorés par les agriculteurs et à *fortiori* de respecter les conventions internationales ratifiées par l'Algérie quant à l'interdiction de ces pesticides dans les domaines de foresterie et de l'agriculture.



**Références**

- ACTA** : Association de Coordination Technique Agricole,( **2004**). Index phytosanitaire, 40ème édition, p:804.
- Agritox: Note de réévaluation REV., (2007)**. 13 ème evaluation préliminaire des risques et de la valeurs de l'endosulfan .Canada.
- Altuntas I., Delidas N., D.K.,Orzmen S. et Gultekin F., (2002)**. Role of reactive oxygen species in organophosphate insecticide phosalone toxicity in erythrocytes in vitro. *Toxicologie in vitro*, 17:153-157.
- AMAP., (2002)**. Evaluation 2002 du Programme de surveillance et d'évaluation arctique. The Pesticide Manual, (2003), The Pesticide Manual : A World Compendium (13ème édition), Conseil britannique pour la protection des récoltes, Royaume-Uni.
- Aruoma O.I., Spencer J.P.E., Buther J., Halliwell B., (1995)**. Commentery reaction of plant-derived and synthetic antioxidants with trichloromethylperoxyl radicals, *free red re s*, 22:187-190.
- ATSDR**: Agency for Toxic Substances and Disease Registry,(**2000**). Toxicological profile for endosulfan. Atlanta, USA.
- Avissar N., Whitin J.C., Allen P.Z., (1989)**. Plasma selenium-dependent glutathione peroxidase. *J.Biol. Chem.*, 2: 15850-15855.
- Balloy G., Hereult S., Israel R., Robin A., Saout C., Traclo R., (2004)**. Les pesticides dans l'eau potable.*France*, p : 5-9-10.
- Bamforth CW., (1999)**. Beer haze. Journal of American society of brewing chemists, vol 57, p: 81690.
- Beauchamp C., Fridovich I., (1971)**. Assay of superoxide dismutase.*Anal Biochem*.44: 276-87.
- Bidet D., Gagnault J.C.,Girard P.,Trotin F., (1987)**. Inflammation, douleur et acide arachidonique:du jardin des hespérides à la cascade de l'acide arachidonique:les flavonoides, *l'actualité chimique*. P: 87-97.
- Blanchemaison P., (2000)**. Les phlébotoniques de 1930 à nos 'jours. *Act Med Angiologie* ; 54 :4-473.
- Bors W., Michel C., Stettmaier K., (1997)**. Antioxidant effects of flavonoids. *Biofactores* 6: 399-402.

- Bouchon C., Lemoine S., (2003).** Niveau de contamination par les pesticides des chaîne trophique des milieux marins. *Cotiers de la Guadeloupe et recherche de bio marqueurs de génotoxici*, université des Antilles et de la Guyane Guadeloupe, France, P : 30.
- Boulkour S., (2004).** Etude du rôle des flavonoides dans la prevention de la toxicité hématologique, hépatique et rénale de la Vinblastine, l'Isoniazide et du Paracétamol. *Thèse de magister de toxicologie, université de Jijel, Algérie*, p: 20-40.
- Bravo L., (1998).** Polyphenol ; chemistry, dietary source, metabolism and nutritional significance, *Nutrition REVIEWS*.545 (11) ,317-333.cité par:peronny Sylvie.
- Brigon J.M., (2006).** Données technico-économiques sur les substances chimiques en France: endosulfan, *INERIS*.
- Bruneton J., (1993).** Pharmacognosie, phytochimie plantes médicinales, 2<sup>ème</sup> édition, technique et documentation, Lavoisier, P :200-211-213-268-315-319.
- Buleon A., Metayer P.G., (2004).** Projet de biologie structurale des poly phénols. *Ed: Mini (parie)*, p : 55-98.
- Burton G.W., Ingold K.U., (1984).** 13-carotene an unusual type of lipid antioxidant. *Sciences*, 224: 569-573.
- Cadet J., Bellon S., Berger M., Bourdat A.G., Douki T., Duarte V., Frelon S., Gasparutto D., Muller E., Ravanat J.L., Sauvaigo S., (2002).** Recent aspects of oxidative DNA damage: guanine lesions, measurement and substrate specificity of DNA repair glycosylases, *Biol. Chem.*, 383(6), p. 93.
- Calger Y.,Kaya M., Belge E., Mete U.O.,(2003).** Ultrastructural evaluation of the effect of endosulfan on mice-kidney, histology and histopathology (histol histopathol), vol :18, issue 3pg , 703-8.
- Cao G., Sofic E., Prior RL., (1997).** Antioxidant and prooxidant behaviour of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radic Biol Med* 22:749-60.
- Chebab S., (2008) .** Etude du stress oxydatif secondaire à la contamination potentielle des eaux d'alimentation de la ville de Jijel par les pesticides. *Thèse de magistère de l'université de Jijel, Algérie*, p : 3-4.
- Cher D. et al., (2004).** Green tea and tea polyphenol's in cancer prevention, *Front Biosci*, vol9, p: 2618.
- Clairborne A., (1985).** Catalase activity. In: Greenwald RA, editor. *CRC Handbook of Methods for Oxygen Radical Research* .Boca Raton, FL: CRC Press, p :283-4.
- Cook N.C. and Samman S., (1996).** Flavonoids-chemistry, metabolism Cardioprotectives effects and dietary sources *J. Nutr. biochem. Vol:7*.

- Cos P., Ying L., Calomme M., Hu J.P., Cimanga K., Poel B.V., Pieters L., Vlietink A.J. and Berphe D.V., (1998).** Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and super oxide scavengers, *J. Nat. prod.*, 61.P:71-76.
- Courrière, le 17 juin 2005.** compagne de sensibilisation aux dangers des pesticides neurotoxique, p : 15.
- Crompton M., (1999).** The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *J. Biochem.*, 341: 233-249.
- Crossman A.R., Neavy D., (2004).** Neuroanatomie, *coordination scientifique de l'édition française elsivier*, p : 2-2-11-14.
- Curtin J.F., Donovan M., Cotter T.G., (2002).** Regulation and measurement of oxidative stress. in *Apoptosis J. immunol. Methode*, 265, p. 49-72.
- Dalsenter et al., (1999).** Reproductive Effects of Endosulfan on Male Offspring of Rats Exposed During Pregnancy and Lactation. *Human and Experimental Toxicology*. 18:583-589.
- Dalton T.P., Shertzer H.G., Puga A., (2002).** Regulation of gene expression by reactive oxygen, *Signalling*, 14, p. 879.
- Das H.C., Wang J.H., Lien E.J., (1994).** Carcinogenicity and Cancer preventing Activites of flavonoids: A structure -system-activity relationship (SSAT) analysis, p: 133-136.
- Dejonckheere W., Steuraut.W. And Kips R.H., (1975).** Pesticide residues in strawberries, *toxicol Appl pharmacol*.P:58-63.
- Delattre J., Beaudoux J-L., Bonnefort-Rousselot D., (2005).** Radicaux libres et stress oxydant : Aspect biologiques et pathologiques. Tec et Doc Lavoisier, Londres -Pris -New York.
- Denier van der Gon, H.A.C., Van het Bolscher, M., Visschedijk, A.J.H., Zandveld, P.Y.J., (2005).** Study to the effectiveness of the UNECE Persistent Organic Pollutants Protocol and cost of possible additional measures – Phase I : Estimation of emission reduction resulting from the implementation of the POP Protocol. TNO Report 2005/194, Apeldoorn, The Netherlands.
- Didry N., Pinkas M., Torck M., (1982).** Sur la composition chimique et l'activité antibactérienne des feuilles de diverses espèces de grindella, pl, *Med, phytother*.P: 7-15.
- Directive européenne 91/414/CE du 15 Juillet 1991.**
- Dixon R.A., (2004).** Phytoestrogens, *Amm, Rev; Plantbiol*, 55.P:225-261.

- Domanage N., (2005).** Etude des transferts de produits phytosanitaires à l'échelle de la parcelle et du bassin versant viticole(Rouffach ,H-Rhin).*Thèse de doctorat, université Louis Pasteur Strasbourg I,France ,p:285.*
- Dorval et Hontela, (2003).** Role of glutathione redox cycle and catalase in defense against oxidative stress induced by endosulfan in adrenocortical cells of rainbow trout(*Oncorhynchus mykiss*), *elsevier,san diego*, vol :192, n :2, p :191-200.
- Droge W., (2002).** Free radicals in physiological control of cell function. *Physiol Rev.* 82:47-95.
- Dubois C., (2006).** Les arbres fruitiers. *Rustica éditions*.P:101.
- Edelahi M.C., (2004).** Contribution à l'étude de dégradation in situ des pesticides par procédés d'oxydation avancée faisant intervenir le fer : application aux herbicides phényl urées.*Thèse de doctorat de l'université de Marne La-vallée.*
- EFSA:European Food Safety Authority, (2005).**
- EL-Hossary, G.A., Selim M.A., Sayed A.E., Khaleel A.E., (2000).** Study of the flavonoid content of *Bassia muricata* and *Bauhinia racemosa* . *Bull Fac pharm Cairo Univ*,38, p:93-97.
- Ellman G.L., (1959).** Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys.*82: 70-7.
- EPA , (2004).** Pesticides Industry sale and usage, Market estimates2000-2001.
- Extonext,(1993).** Est un effort de coopération de l'université de Californie-davis, Oregon state université, Cornell university et l'université de l'Iaho primaire fichiers sont archives et mis a jour de l'Oregon state university.
- Favier A., (2003).** Le stress oxydant: Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *Review. L'actualité chimique- novembre*, p: 108-115.
- Forkman G., (1992).** Structure and biosynthesis of flavonoids. *Proceeding international conference of Group poly phenol. V:16, P: 19-27.*
- Frank C. LU., (1991).** Toxicologie, données générales procédures d'évaluation organes cibles évaluation du risques. *Masson, n: 3-13-228-282.*
- Frankel E.N., Kanner J., German J.B., Parks E., Kinsella J.E.Q., (1993),** Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine, *Lancet*, 341(8843), 454-457.
- Fulbert J.C., Cals M.J., (1992).** Les Radicaux libres en biologie clinique. *Pathol. Biol.*, 49(1), 66-77.

- Fulbert J.C., Cals M.-J., (1992).** Les Radicaux libres en biologie clinique. *Pathol. Biol.*, 49(1), 66-77.
- Gardès-Albert M., Bonnefont-Rousselot D., Abedinzadeh Z., Jore D., (2003).** Espèces réactives de l'oxygène : Comment l'oxygène peut-il devenir toxique ? *L'actualité chimique*, - novembre-décembre, N°96.
- Germain E., Bonnet P., Aubourg L., Grangeponne M.C., Chajès V., Bougnoux P., (2003).** Anthracycline-induced cardiac toxicity is not increased by dietary omega-3 fatty acids. *Pharmacological Research* 47, 111-117.
- Ginseberg G., Hattis D., Sonawane B., (2004).** Incorporation pharmacokinetic differences between children and adults in assessing children's risks to environmental toxicants, *Toxicol appl pharmacol*, p:198:164-83.
- Hahida F. and wanasundra, P.K.J.P.D., (1992).** Phenolics antioxidants, *Git. Rew. Foodsci. Nutr.* 32(1), p: 67-103.
- Halliwell B., Cross C. E., (1994).** Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. *Environ. Health Parps.* 102 (Suppl. 10): 5-12.
- Halliwell B., Gutteridge J.M.C., (1999).** *Free Radicals in Biology and Medicine*, 3rd ed., Oxford University Press.
- Halliwell B., Gutteridge J.M.C., (2007).** *Free Radicals in Biology and Medicine*. 4 Ed. Oxford university Press, pp: 20-31.
- Harbone J.B., (1964).** biochemistry of phenolic compounds, *Academic press, New york.*
- Harbone J.B., Baxter, H.Eds., (1999).** The handbook of natural flavonoids. *Jean Wiley and Sons, Chichester, vol: 1.*
- Harmon J.B., (1994).** The flavonoids advances in research since 1986. *Etited by chapman&al.*
- Harrison R., (2002).** Structure and function of xanthine oxidoreductase: Where are we now, *Free Radic-bio-med* 33, pp. 774-797.
- Hayase F., Katom, (1984).** Antioxidant compounds of sweet potatoes, *J, Nutri, Sci, Vitaminol*, 30:37-46.
- Henderson L.M., Chappell J.B., Jones O.T.G., (1989).** Superoxide generation is inhibited by phospholipase A. *Biochem. J.*, 2: 249-255.
- Hennebelle T., Sahpaz S., Bailleul F., (2004).** Poly phénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif, Springer paris, p :3-6.
- Hill K.E., White J.G., Rao G.H.R., (1989).** Role of glutathione and glutathione peroxydase in human platelet arachidonic acid metabolism. *Prostaglandins*, 3: 21-32.

- Hollman P.C.H, Devries J.H.M., Valeeven S.D, Mengelers M.J.B. et Katan M.B., (1995).** Adsorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers *Amer J.:clin Nutr*,62.P:1276-1282.
- Hostettmann K., Potteray O. and Wolfender J. L., (1998).** The potential of higher plants as a source of new drugs. *Chimie*, 52, p : 10-17.
- Husain S.R., Gillard J., Gillard P., (1987).** Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids, *phytochemistry*, 26:2489-2491.
- Kalender S., Kalender Y., Ogutar A.U., Zunhisarcikli M., Durk D., Acikgoz F., (2004).** Endosulfan induced cardiotoxicity and free radical metabolism in rats : the protective effect of vitamin E.
- Kitta K.,Hagiwara Y.and shilamoto T.,(1992).** Antioxidative activity of an iso flavonoid,2''-o-Glycosylisovitex in isolated from green barley leaves, *J.Argic.Food.Chem.*,40,p:1843-1845.
- Knecht K.T., Mason R.P., (1988).** In vivo Radical trapping and biliary secretion of Radical adducts of carbon tetrachloride-derived free Radical metabolites.*Drug Metab. Dispos.* 813-817.
- Labie D., (2007).** Neurotoxicité des produits industriels et développement cérébral, *médecine/sciences.P:868-869-870.*
- Lahouel M., (1985).** Etude de la toxicité hématologique, hépatique et rénale de deux médicaments anticancéreux : La Doxorubicine et la CCNU chez le rat, *thèse de doctorat, Rouen France*, p :32-35.
- Lairon D., (2000).** Biodisponibilité et effets biologiques des anti-oxydants de nature polyphénolique.*Ed : Flammarion (Paris).P :57-76.*
- Langhton M. et al., (1991).** Inhibition of mammalian 5-lipoxygenase and cyclo-oxygenase by flavonoids and phenolic dietary additives. Relationship to antioxidant activity and to iron ion reducing ability.*Biochem pharmacol*, vol42, p: 1673-1681.
- Laughton M.,Evans P., Moroney M., Houlst J., Halliwell B., (1991).** Inhibition of mammalian 5-lipoxygenase and cyclo-oxygenase by flavonoids and phenolics dietary additives, relationship to antioxidant activity and to iron-reducing ability-*Biochim, pharmacol*, 42, 1673-1681.
- Lauret A., (1985).** Phénols, *Encyclopédia Universalis*, p : 422-425.
- Le Bot M.A., Bégué J.M., Kernaleguen D., Robert J., Ratanasavanh D., Riché C., Guillouzo A., (1988).** Different cytotoxicity and metabolism of doxorubicin, daunorubicin, epirubicin, esorubicin and idarubicin in cultured human and rat hepatocytes. *Biochemical Pharmacology* 37, 3877-87.

- Lefevre G., Beljean-Leymarie M., Beyole S., Rousselot D., Cristol J.P.R. Therond P., and Thorreilles J., (2003).** Evaluation de la peroxydation lipidique par le dosage des substances réagissant avec l'acide thiobarbiturique. *J : Ann Biol Clin.* 56, P : 305.
- Llorca P.M., Cherean I., Brousse G., Schawn R., (2004).** Alimentary or toxic-induced psychiatric disorders, *EMC-psychiatric*, p: 195.
- LNE :** Laboratoire national de métrologie et d'essais, Janvier 2008. *Paris*, p: 1-2-3-4-6-7.
- Logani M.K., Davies R.E., (1980).** Lipid peroxydation, biologic affects and antioxydants. 15, P : 485-495.
- Lowry O.H., Rosegrough N.J., Farr A.L., Randall R.J., (1951).** Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* .193:265-75.
- Mabry T.J., Ulubelen A., (1980).** Chemistry and utilisation of phenylpropanoids including flavonoids, coumarins and lignans, *J, Qrgic, Food chem.*, 28,:188-196.
- Manach C., Texier O., Rgerat F., Agullo G., Demigne C. et Remesy C., (1996).** Dietary quercetin is recovered in rat plasma as conjugated derivatives of isorhamntin and quercetin. *Nuter Biochem*, 7.P:375-380.
- Marfak A., (2003).** Radiolyse gamma des flavonoides: Etude de leur réactivité avec les radicaux issus des alcools: formation des depsides. *Thèse de doctorat de l'université de Limoges*, pp 24-42.
- Marieb E.M., (2000).** Biologie humaine anatomie et physiologie, 6<sup>ème</sup> édition *Deboeck univesirté*, p:206-218.
- Marieb E.M., (2008).** Biologie humaine anatomie et physiologie, 8<sup>ème</sup> édition, *Pearson education, France*. P :222-245-246-257-264-271-272-278-283-286 .
- Mekkiou R., (2005).** Extrait de these de doctorat, recherché et détermination structurale des metabolites secondaires d'espèces du genre *Genista (Fabaceae): G. saharae, G. Ferox.*, p:43.
- Meyer A., Chrisman J., Moreira J.C. and Koifman S, (2003).** Enviromental research, p:264-271.
- Meyers G.J., Davidson P.V., Cox C. et al., (2003).** Prenetalmethyl mercury exposure from ocean fish consumption in the Seychelles child development, *study lancey*. 361:1686-92.
- Mikolajski A., (2007).** Arbres fruitiers. *Marabout*, p :118.
- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. (1979).** Assay of lipid peroxides in animal tissue by thiobarbituric reaction. *Anal Biochem*.95: 351-8.

- Okamura H., Mimura A., Yakou Y., Niwano M., Takahara Y. (1993).** Antioxidant activity of tannins and flavonoids in *eucalyptus rostrata phytochem*, 33:557-561.
- Okuda T., Kimura Y., Yoshida T., Okuda H., Aruchi S., (1983).** Studies on the activities of tannins and related compounds from medicinal plants and drugs, inhibitory effects of lipid peroxidation in mitochondria and microsome of liver ,*chem. Pharm, bull*,31:1625-1631.
- Olanow C.W., (1993).** Trends in *Neuro. SC.*, 16, p. 439-444.
- Ollat H., (2004).** La neurotoxicité de l'alcool neuropsychiatries tendances et débats .24 :25.
- OMS: organisation mondiale de la santé (1965).** Food and agriculture organisation of the United Nations.
- Orgogozo et al., (1997).** Wine consumption dementia in the already; A prospective community study in the Bordeaux area.*Rev. Neural*, vol: 153, p: 192.
- Pein F., Vassal G., Sakiroglu C., Tournade MF., Lemerle J., (1995).** Aspects pédiatriques de la toxicité cardiaque des anthracyclines et implications pratiques pour sa prévention. *Archives Pédiatriques*. 1995 ; 2(10) : 988-999.
- Pincemail J., Meurisse M., Limet R., Defraigne J., (1999).** Evaluation du stress oxydant: une réalité pour le médecin généraliste. *Vaisseaux, Cœur, Poumon*. 4, p. 148-154.
- Pincemail J., Siquet J., Chappelle J.P., (2000).** Evaluation des concentrations plasmatiques en antioxydants anticorps contre les LDL oxydées et homocysteine dans un échantillon de la population liégeoise. *Ann Biol Chin*. 58, p.178-185.
- PISSC., (1984).** Programme international sur la sécurité des substances chimiques, Critère d'hygiène del'environnement 40, Endosulfan. Organisation mondiale de la santé, Genève.
- Quezel P. and Santa S., (1963).** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. *Tome I, C, N, R, S. Paris*.
- Rahman I., Morrisson D., Donaldson K., Maccnee W., (1996).** Systemic oxidative stress in asthma, COPD, and smokers. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 154, 1055-1060.
- Ramade F., (1993).** Dictionnaire encyclopédique des pollutions, les polluants de l'environnement à l'homme. Ediscience international.
- Ramé A., Théron S., (2006).** Anatomie et physiologie, *elsevier masson* , p :45-46-47-48-49.
- Ravn H., Andary C., Kovacs G., Milgaard P., (1984).** Caffeic acid esters as in vitro inhibitors of plant pathogenic bacteria and Fumgi, *biochem, syst, Ecol*, 17:175-184.

**Rekha chemical health&safety**, May/June2005.

**Richer G., (1993).** Métabolisme des végétaux, physiologie at biochimie.*press phytotechniques et universitaires romades*, p:319-321.

**Roula M., (2009).** Evaluation du risque de contamination des légumes par les résidus des pesticides.*Thèse de magistère université de Jijel, Algérie*, p : 4-5-6-16.

**Sanborn M., Cole F., Kerr K., Vakil C., Sanin L.H., Bassil K.,(2004).** Pesticides literature review.*Ontario college of family physicians*,p:186.

**Sanmugapriya E., Venkataraman S., (2006).** Studies of hepatoprotective and antioxidant actions of *Strychnos potatorum* Linn.Seeds on CCL<sub>4</sub> induced acute hepatic injury in experimental rats .*J Ethnopharmacol*.105:154-60.

**Sarni M.P., Cheynier V.,(2006).** Les poly phénols en agroalimentaire, *Lavoisier, édition Tec&Doc. P :2-3-8-9-20-45-93-363-379-398.*

**Scalbert A., Williamson G., (2000).** Dierty intake and bioavaibility of polyphenols. *J: Nutr*, 130, P: 273-285.

**Schisler N.J., Singh S.M., (1989).** Effect of ethanol in vivo on enzymes which. detoxify oxygen free Radicals. *Free Radical Biol. Med.* 7 : 117-123.

**Schmitt B., Roger L., Krempy M.,Cherbit C., Legrand P., Gueguen L.,Hercberg S., Guihot-Joubrel G. (1998).** Nutrition et santé innovation qualité sécurité alimentaire, *britta nutrition.*

**Servais S., (2004).** Altérations mitochondriales et stress oxydant pulmonaire en réponse à l'ozone : Effets de l'âge et d'une supplémentation en oméga-3, *Thèse de doctorat, Université Claude Bernard-Lyon 1, France*, pp. 19-35.

**SFA : Société Française des antioxydants, (2007).**

**Shaphiq-ur-Rehman, (2006).** Endosulfan toxicity an dits reduction by selenium :A behavioral, hematological and peroxidative stress evaluation, *the internet journal of toxicology*, vol :3, number 1.

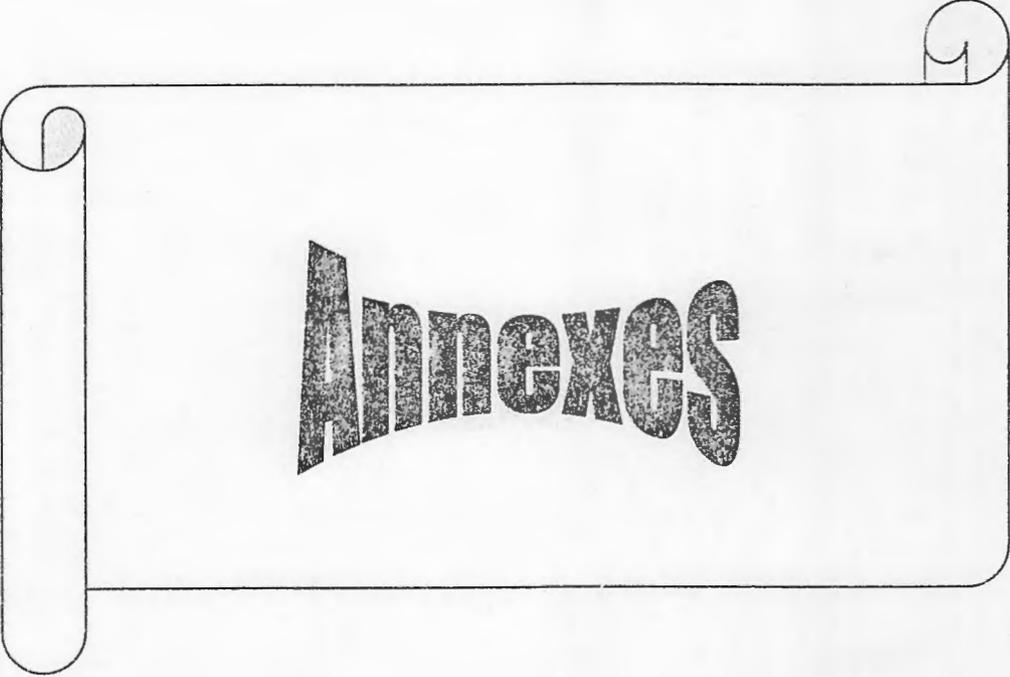
**Silverton D.U., (2007).** Physiologie humaine 4<sup>ème</sup> édition PEARSON, p:281-285-286

**Singal P.K., Petkau A. Gerrard J.M., (1988).** Free Radicals in health and disease. *Mol. Cell. Biochem.* 121-122.

**Sinha B.K., Mimnaugh E.G., Myers C.E., (1989).** Adryamicin activation and oxygen free Radical formation in human breast tumor cells. *Cancer Res.* 49: 3844-3848.

**Stanley et al., (2003).** Antioxidant and the free radical theory of degenerative disease, *alternative medicine and rehabilitation.*

- Stavric B. Matula T.I., (1992).** Flavonoids in foods, *nutrition and health*, p: 274-294.
- Stockholm (2001).** La convention de Stockholm sur les polluants organiques persistants, Genève.
- Stockholm (2007).** Programme des nations unies pour l'environnement, Genève.
- Sylvie P., (2005).** Articles extrait de la thèse de doctorat : auto-épuraton des rejets organiques domestique, nature de la matière organique résiduaire et son effet en rivière. P :20.
- Thannickal V. J., Fanburg B. L., (2000).** Reactive oxygen species in cell signalling. *Am. J. Physiol.* 279: L1005- L10281.
- Tiffany-Castiglioni .E., Hong S., Qian Y., Taney Y., Donnelley K.C., (2006).** In vitro models for assessing neurotoxicity of mixtures, *elsevier*, p:3.
- Tillement J.H., (2001).** Protection in vitro des fonctions mitochondriales cérébrales par le E-resveratrol dans les états d'anoxie suivie de réoxygénation. *Bull. Acad. Med.*, 185 (8): 1429-1445.
- Tonlin C., (1994).** The pesticide manual, *incorporating the agrochemicals handbook*.P:171-172.
- UNEP: Programme des nations unies pour l'envirennemet, organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture, (2008).**
- Van Acker S.A.B.E., van den Berg D.J., Tromp M.N.J.L., Griffioen D.H., van Bennekom W.P., van der Vijgh W.J.F., Bast A., (1996).** Structural aspect of antioxidant activity of flavonoids. *Free Rad. Biol. Med.* 20: 331-342.
- Von Sonntag C., (1987).** Enzymes (chap. 14), *The Chemical Basis of Radiation Biology*, Taylor & Francis, Londres, p. 429.
- Yokozawa T.,Chem C.P.,Dong E.,Tanaka T.,Nonaka G.I. and Nishioka I., (1998).** Study on the inhibitory effects of tannins and flavonoids against the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyls radicals,*biochem.pharmacol*,55(2),p:213-222.
- Yoshikawa T., Yamamoto Y., Naito Y., Toyokuni S., (2000).** Free radical in chemistry, biology and medicine. Ed. *Oica International*, London, pp: 31-42.
- Zama D., Meraihi Z., Tebibel S., Benayssa W., Benayache F., Benayache S., Vlietiurk A.J., (2007).** Chloropurifos-induced oxidative stress and tissue damage in the liver, kidney, brain and fetus in pregnant rats: the protective role of the butanolic extract of *paronychia argentea L*, *indian journal of pharmacology*, vol 39, NO : 3, p : 145-150.



**Annexes**

# Annexe 1

## La préparation des solutions

L'eau physiologie :

4.5g NaCl.....500 ml d'eau distillée

KCl 1.15% :

1.15 g... 100 ml d'eau distillée.

TCA 20% :

5g .....25 ml d'eau distillée.

⊗ TBA 0.67% :

0.335g .....50 ml d'eau distillée.

DTNB 0.01 M :

0.01 g .....5 ml d'eau distillée.

Tampon phosphate  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1 M PH 7.2:

0.684g .....100ml d'eau distillée.

Cyanide de K  $10^{-2}$  M :

0.025g .....50 ml d'eau distillée.

⊗ NBT  $1.76 \cdot 10^{-4}$  M à partir de  $10^{-2}$  M :

0.3ml de NBT  $10^{-2}$  M.....1.4 ml d'eau distillée.

EDTA  $66 \cdot 10^{-3}$  M :

0.964g .....50ml d'eau distillée.

Riboflavine  $2 \cdot 10^{-6}$  M :

0.0001g .....125ml d'eau distillée.

$\text{NaH}_2\text{PO}_4$  :

0.119 g.....100ml d'eau distillée.

La solution C

0.0075g de sulfate de cuivre.....0,75 ml d'eau distillée.

La solution B

0.015g de tartrate de Na/K.....0,75 ml d'eau distillée.

NaOH 0.1 mol/l :

1 g.....250ml d'eau distillée.

La solution A

1,5g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ..... 75ml NaOH.

La solution d'endosulfan

50mg ..... 150ml d'huile de maïs.

Le réactif de Lowry

0,75ml de solution C + 0,75ml de solution B + 75ml de solution A.

## Annexe 2

**Tableau : Composition du mélange réactionnel de la SOD.**

Solution	Volumes (ml)	Concentration (M)
Cyanide de Potassium	1	$10^{-2}$
EDTA	1	$6.6 \times 10^{-3}$
NBT	0.1	$1.76 \times 10^{-4}$
Riboflavine	0.1	$2 \times 10^{-6}$

**Tableau : Les quantités et les volumes administrés de poly phénols et d'endosulfan pour chaque rat dans les différents lots.**

Lots	Rats	Poids	Quantité d'endosulfan (mg)	Volume administré (ml)	Quantité de PP (mg)	Volume administré (ml)
<b>Intoxiqué</b>	R <sub>1</sub>	160.4	0.64	1.92		
	R <sub>2</sub>	188.4	0.75	2.25		
	R <sub>3</sub>	169.7	0.67	2.01		
	R <sub>4</sub>	133.4	0.33	1.59		
	R <sub>5</sub>	167.6	0.70	2.01		
<b>Préventif</b>	R <sub>1</sub>	209.4	0.83	2.49	20.94	2.09
	R <sub>2</sub>	188.4	0.57	2.25	18.84	1.88
	R <sub>3</sub>	142.4	0.50	1.68	14.24	1.42
	R <sub>4</sub>	171.7	0.68	2.04	17.17	1.71
	R <sub>5</sub>	201.4	0.88	2.64	22.14	2.21

**Tableau : Evaluation du taux du MDA en nmol/g de tissu neuronale dans le cas de différents traitements.**

Lots	Rats	Résultats	Moyens±écart type
<b>Témoin négatif</b>	1	0.103	0.104±0.02
	2	0.123	
	3	0.065	
	4	0.125	
	5	0.104	
<b>Témoin positif</b>	1	0.149	0.141±0.007
	2	0.129	
	3	0.142	
	4	0.139	
	5	0.144	
<b>Préventif</b>	1	0.127	0.130±0.004
	2	0.131	
	3	0.132	
	4	0.134	
	5	0.124	

**Tableau : Evaluation du taux du glutathion en m mol /g de tissu dans le cas de différents traitements.**

Lots	Rats	Résultats	Moyen±écart type
<b>Témoin négatif</b>	1	0.46	0.43±0.14
	2	0.52	
	3	0.41	
	4	0.19	
	5	0.57	
<b>Témoin positif</b>	1	0.14	0.093±0.06
	2	0.010	
	3	0.11	
	4	0.17	
	5	0.037	
<b>Préventif</b>	1	0.037	0.21±0.14
	2	0.28	
	3	0.41	
	4	0.11	
	5	0.25	

**Tableau: Evaluation de l'activité de la SOD en UI/mg de tissu neuronale dans les différents lots.**

<b>Lots</b>	<b>Rats</b>	<b>Résultats</b>	<b>Moyen±écart type</b>
<b>Témoin négatif</b>	1	388.94	352.43±23.53
	2	357.19	
	3	341.31	
	4	325.47	
	5	349.25	
<b>Témoin positif</b>	1	134.94	150.85±35.96
	2	166.87	
	3	182.56	
	4	95.25	
	5	174.62	
<b>Préventif</b>	1	222.25	260.35±32.45
	2	246.06	
	3	269.87	
	4	309.56	
	5	254	

**Tableau : Evaluation du taux des protéines en µg/g de tissu neuronale dans le cas de différents traitements.**

<b>Lots</b>	<b>Rats</b>	<b>Résultat</b>	<b>Moyen±écart type</b>
<b>Témoin négatif</b>	1	804.12	777.99±30.27
	2	761.62	
	3	816	
	4	746	
	5	762.25	
<b>Témoin positif</b>	1	526.26	514.24±19.36
	2	537.87	
	3	517.25	
	4	491.62	
	5	497.87	
<b>Préventif</b>	1	613.50	607.37±19.76
	2	605.37	
	3	595.37	
	4	585.37	
	5	637.25	

# Annexe 3

## Les courbes d'étalonnages

### \* La courbe d'étalonnage du MDA

Les résultats qui nous ont permis de dessiner la courbe d'étalonnage sont les suivantes :

[MDA] nmol/ml	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7
DO	0	0.081	0.165	0.249	0.333	0.417	0.500	0.585

### Etablissement de la courbe :

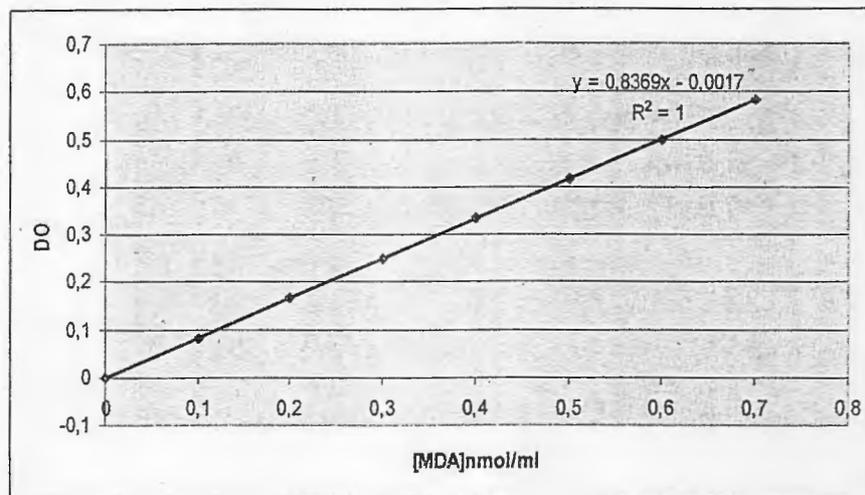


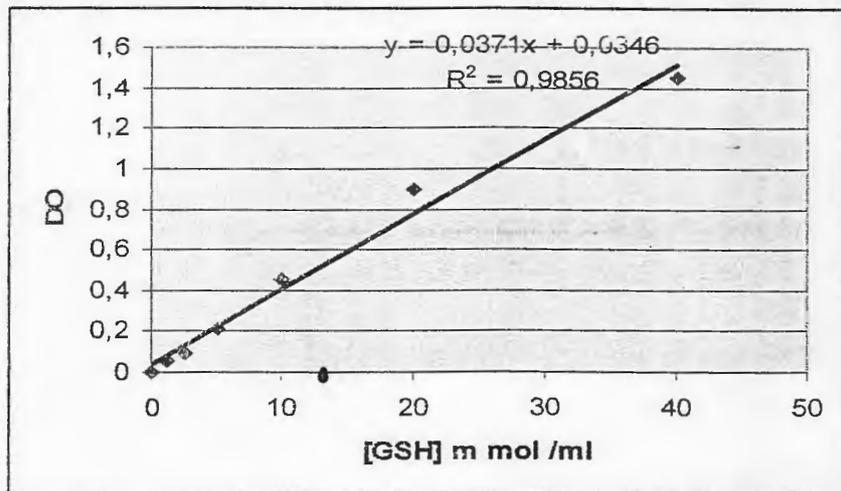
Figure : Courbe d'étalonnage du MDA

### \* La courbe d'étalonnage du GSH :

Les mesures qui nous ont permis de dessiner la courbe d'étalonnage (Fig...) sont les suivantes :

[GSH] m mol/ml	0	1.25	2.5	5	10	20	40
DO	0	0.06	0.088	0.217	0.45	0.9	1.45

**Etablissement de la courbe :**



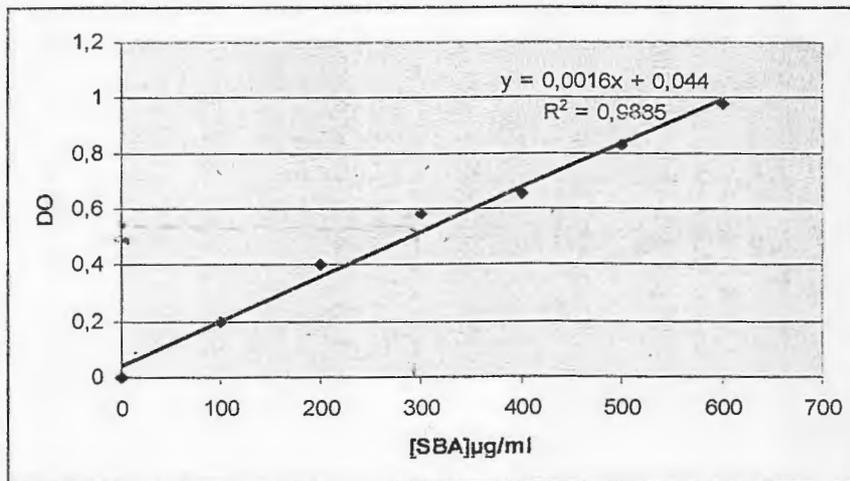
**Figure: Courbe d'étalonnage du glutathion.**

**\* La courbe d'étalonnage de SBA**

Les résultats qui nous ont permis de dessiner la courbe d'étalonnage sont les suivantes :

[SBA]µg/ml	0	100	200	300	400	500	600
DO	0	0.2	0.4	0.58	0.652	0.83	0.976

**Etablissement de la courbe :**



**Figure : Courbe d'étalonnage du SAB**

*Handwritten note:* 10/17

*Handwritten note:* Le napade

<b>Réalisé par :</b> <b>GOUDER Leila</b> <b>BOULTIOUR Wafa</b>	<b>Titre : Effet neurotoxique de l'endosulfan et la prévention de cette toxicité par l'extrait des polyphénols</b>	<b>Date de soutenance</b> <b>04/07/2009</b>
--	--	--

### Résumé

Depuis longtemps, l'endosulfan est utilisé comme produit phytosanitaire. Cependant, cet organochloré malheureusement il présente un effet neurotoxique allant jusqu'à déséquilibrer le statut redox des cellules nerveuses. Les résultats obtenus dans la présente étude montrent la diminution des enzymes antioxydants SOD, CAT, GSH et les protéines cytosoliques ainsi qu'une augmentation du MDA témoignant d'une lipoperoxydation excessive pouvant provoquer une lyse des cellules nerveuses et leur dégénérescence. Ceci peut réduire la masse cellulaire du cerveau donnant ainsi des maladies graves telles que le parkinson et l'Alzheimer. Par contre, l'utilisation des polyphénols n'a pas été efficace dans le maintien de l'équilibre de la balance oxydative dans la chémoprotecteur des cellules nerveuses contre les ROS.

**Mots clés :** Endosulfan, organochloré, neurotoxique, lipoperoxydation, polyphénols.

### Abstract

From a long time, endosulfan is used as a plant protection product. However, this organochlorine unfortunately it has a neurotoxic effect up to disrupt the redox status of the nerve cells. The results reduced the amount of antioxidant enzymes SOD, CAT, GSH and cytosolic proteins and an increase in MDA demonstrating a lipoperoxydation excess can cause lysis of cells and nerve degeneration. This may reduce the cell mass of the brain giving rise to diseases such as Parkinson and Alzheimer. Against by the use of polyphenols has not been effective in maintaining the balance of the chemoprotection of nerve cells against the ROS.

**Key words:** Endosulfan, organochlorine, neurotoxic, lipoperoxydation, polyphenols

### ملخص

منذ فترة طويلة استعمل الإندوسولفان كمادة حافظة للنباتات و لكن لهذه الكلوريدات العصبية أضرار سمية للجهاز العصبي. يمكن أن يؤدي عدم توازن الميزان التأكسدي. النتائج المتحصل عليه من هذه الدراسة تبين انخفاض في الإنزيمات المضادة للاكسدة SOD، CAT، GSH و البروتينات السيتوزولية و ارتفاع في MDA تشهد على فوق أكسدة ليبيدية التي تطل الخلايا العصبية و تلفها وهذا ما يؤدي الى انخفاض الوزن الخلوي للدمج و أيضا الى أمراض خطيرة مثل، الألزهايمر و الباركنسون على العكس فاستعمال متعددات الفينول لم تكن فعالة في إعادة توازن الدمج بالوظيفة الكيميائية للخلايا العصبية ضد ROS.

### الكلمات المفتاحية

الإندوسولفان، الكلوريدات العصبية، سمية لجهاز العصبي، فوق أكسدة ليبيدية، متعددات الفينول.