



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR  
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



UNIVERSITE DES FRERES MENTOURI -CONSTANTINE  
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE  
DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE / BIOLOGIE CELLULAIRE ET  
MOLECULAIRE

**THESE**

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

**Option : Biochimie Appliquée**

*Intitulé*

**L'effet protecteur des antioxydants naturels dans  
l'intoxication du mercure chez le rat *Albinos Wistar*  
(Aspects biochimiques, immunologiques et  
histologiques).**

**PRESENTÉ PAR :**

***BAHI AHLEM***

**Membres de Jury :**

**Président :** KHELIFI D (Pr) Université des frères Mentouri -Constantine

**Rapporteur :** NECIB Y (Pr) Université des frères Mentouri -Constantine

**Examineurs:** NOUADRI T (MC) Université des frères Mentouri -Constantine

ABDENNOUR C (Pr) Université Badji Mokhtar-Annaba

KHELILI K (Pr) Université Badji Mokhtar-Annaba

*Année universitaire: 2014-2015*

## REMERCIEMENTS

*« La connaissance est la seule chose qui s'accroît lorsqu'on la partage ».*

*Avant toute chose, je remercie Dieu, le tout puissant, pour m'avoir donnée la force et la patience.*

*J'adresse tout d'abord mes sincères remerciements à Monsieur le Professeur Necib Youcef qui a mis en place toute cette étude et qui m'a appris comment travailler en me faisant partager son expériences et ses connaissances scientifiques. Je le remercie pour sa disponibilité et pour toute sa confiance, son soutien et aussi pour m'avoir supporté et encourager durant toutes ces années. Merci bien Monsieur Necib Youcef.*

*Je souhaite également remercier très chaleureusement le professeur Zerizer Sakina épouse Necib Youcef pour sa grande aide dans la prise des photos et l'interprétation des résultats histologiques et sur son encouragement et sa bonne humeur et sa profonde gentillesse. Merci bien Madame le professeur.*

*J'exprime ensuite mon estime et mes sincères remerciements aux membres de mon jury de soutenance :*

*Monsieur Khelifi D, professeur a l'université de Constantine, qui a accepté de présider ce jury. Je le prie de trouver ici toute ma gratitude et je le remercie pour sa gentillesse et bienveillance.*

*Monsieur Nouadri T, Maitre de conférence a l'université de Constantine, qui ma fait l'honneur d'évaluer et d'examiner cette thèse. Veuillez trouver ici l'expression de ma profonde gratitude et de mon respect.*

*Monsieur Abdennour C et Monsieur Khelili K, professeurs à l'université D'Annaba qui m'ont fait l'honneur en acceptant de participer à ce jury malgré leurs multiples occupations.*

*J'adresse mes sincères remerciements à Monsieur Boulakoud Mohamed Salah, professeur à l'université d'Annaba, qui m'a permis de travailler au sein de son laboratoire pour faire le dosage des cytokines.*

*Je remercie tous ceux qui ont participé de loi ou de prés à la réalisation de cette étude.*

La présente étude visait à évaluer l'effet protecteur de l'huile d'argan et du sélénium contre le stress oxydatif induit par le mercure. Pour cette raison, une étude phytochimique des testes antioxydant in vitro ont été réalisés sur l'huile d'argan pour estimer ses effet attendus. Les résultats ont montré la présence des composés phénoliques à une concentration très importante. L'évaluation du pouvoir piègeur de l'huile d'argan est plus actif avec une  $IC_{50}=13.33 \pm 1.3$ , et in vivo, sur des rats *Albinos Wistar* qui sont traités par le mercure seul ou combiné avec l'huile d'argan et le sélénium, pendant une période de trois semaines, le sang est prélevé ensuite les rats sont sacrifiés et les différents paramètres sont déterminés. A partir de l'analyse de nos résultats, on observe une diminution considérable du gain de poids durant le traitement au mercure seul ou combiné avec l'huile d'argan et le sélénium, mais aucune variation claire du poids relatif du foie, du rein ou de la rate n'a été obtenue. Les résultats ont montré aussi des changements notables dans les paramètres biochimiques, immunologiques et hématologiques. Caractérisés surtout, par une augmentation significative de la concentration sérique du glucose, urée, créatinine, acide urique, bilirubine totale et direct, les lipides totaux, cholestérol, triglycéride, les diène conjugués et l'activité enzymatique de AST, ALT, PAL et LDH. Alors que, la concentration sérique de l'albumine et les protéines totales ont été diminué chez les rats traités au mercure par rapport aux animaux témoins. Les résultats révèlent également une toxicité immunologique et hématologique en particulier chez les lots traités au mercure seul, une augmentation sérique de IL1, IL6 et TNF $\alpha$  et élévation de nombre des globules blancs, une diminution du taux des globules rouges, de la concentration d'hémoglobine, le pourcentage de l'hématocrite et l'activité phagocytaire pendant le traitement par le mercure. Ainsi le traitement des rats par le mercure entraîne une diminution dans la capacité anti-oxydante plasmatique caractérisé par diminution dans la concentration sérique de la vitamine E et C et taux de DPPH et les thiols. Nous avons également observé que les résultats obtenus mettent en évidence le potentiel détoxifiant exprimé par la diminution des taux de glutathion érythrocytaire, hépatique et rénale, les métallothionéine, l'activité enzymatique du système anti-oxydantes SOD, GPx, GST et catalase et une augmentation dans la peroxydation lipidique exprimé par le taux élevé de MDA plasmatique, érythrocytaire, hépatique et rénale. Aussi les résultats ont montré clairement des altérations de substance des tissus étudiés en comparaison avec les témoins, avec des cytolyses hépatocytaires, nécrose hépatique et dégénérescences tubulaires avec nécrose des reins. Par ailleurs la supplémentation de l'huile d'argan et du sélénium a modifié les effets toxiques du mercure et diminué les altérations histologique et montré que les deux antioxydants sont efficaces contre le stress oxydant induit par le mercure.

**Mots clés :** Mercure, Huile d'argan, Sélénium, Stress oxydatif, *Argania Spinosa*, antioxydants.

The present study aimed to evaluate the protective effect of argan oil and selenium against oxidative stress induced by mercury. For this reason, a phytochemical study of antioxidant tested in vitro was performed on argan oil to estimate its expected effect. The results showed the presence of phenolic compounds in a very high concentration. The evaluation of power scavenger argan oil is more active with  $IC_{50} = 13.33 \pm 1.3$ , and in vivo on Albino Wistar rats were treated with mercury alone or combined with argan oil and selenium, for a period of three weeks, the blood is then withdrawn and the rats are sacrificed the various parameters are determined. From the analysis of our results, we observed a significant reduction in weight gain during treatment with mercury alone or combined with argan oil and selenium, but no clear change in the relative weight of liver, kidney or spleen was obtained. The results also showed significant changes in biochemical parameters, immunological and haematological. Characterized primarily by a significant increase in serum glucose, urea, creatinine, uric acid, total and direct bilirubin, total lipids, cholesterol, triglyceride, conjugated diene and the enzymatic activity of AST, ALT, LDH and PAL. dropoff window Whereas serum concentrations of albumin and total protein were reduced in treated rats compared to mercury control animals. Results also show immunological and haematological toxicity especially among the treated groups the pure mercury, an increase in serum IL-1, IL-6 and TNF and elevated white blood cell count, decreased red blood cell levels, hemoglobin concentration the percentage of hematocrit and phagocytic activity during treatment with mercury. Thus the treatment of the rats with the mercury causes a reduction in the plasma antioxidant capacity characterized by decrease in the serum concentration of vitamin E and C and rate of DPPH and thiols. We also observed that the results obtained highlight the detoxifier potential expressed by the decrease in erythrocyte glutathione levels, liver and kidney, metallothionein, the enzymatic activity of the antioxidant system SOD, GPx, GST and catalase and increased in lipid peroxidation expressed by the high levels of plasma MDA, erythrocyte, liver and kidney. Also the results clearly showed substantive alterations of tissue studies in comparison with the control, with hepatocyte cytolysis, hepatic necrosis and tubular degeneration with necrosis of the kidneys. Furthermore supplementation argan oil and selenium changed the toxic effects of mercury and decreased histological alterations and showed that both antioxidants are effective against oxidative stress induced by mercury.

**Keywords:** Mercury, Argan Oil, Selenium, Oxidative Stress, Argania Spinosa, antioxidants.

إن الهدف من هذه الدراسة هو معرفة مدى التأثير الواقى لزيت الأركان و السلينيوم ضد الإجهاد التاكسدي الناتج عن الزئبق، لهذا قمنا بدراسة على زيت الأركان لمعرفة قدرته المضادة للأكسدة في الوسط الخارجي. أوضحت النتائج وجود كمية معتبرة من المركبات الفينولية. كما أقيمت دراسة مخبرية على جردان المعاملة بالزئبق فقط أو مندمج مع زيت الأركان و السلينيوم في مدة ثلاثة أسابيع. بعد نهاية فترة المعاملة تم سحب الدم ثم قتل الفئران و سحب الأعضاء لدراستها. النتائج المتحصل عليها أوضحت نقص معتبر في وزن الفئران خلال فترة المعاملة بالزئبق وحده أو مرتبط مع زيت الأركان و السلينيوم في حين لم نسجل أي تغيرات في وزن الكبد، الكليتين و الطحال. كما أوضحت النتائج أيضا اضطرابات في المؤشرات البيوكيميائية، المناعية و الدموية والمتمثل أساسا في ارتفاع معنوي في تركيز الغلوكوز ليوريا، الكرياتين، البليغوبين، الليبيدات، الكولسترول و نشاط إنزيمات ناقلات الأمين في حين تركيز الألبومين و البروتينات الكلية نقصت مقارنة مع الشواهد. كما أوضحت النتائج كذلك اضطرابات في مستوى المؤشرات المناعية و الدموية تجلت خاصة في انخفاض معنوي في جل هذه المعايير. كما أدت معاملة الفئران بالزئبق إلى نقص في التركيز المصلي للفيتامينات و كمية الثيول صاحبه نقص في مستوى الجلوتاثيون و الإنزيمات المضادة للأكسدة. في حين أظهرت المقاطع النسيجية وجود نخر على مستوى الكبد والكلى لدى الفئران المعاملة بالزئبق مقارنة بالشواهد، بالمقابل المعاملة بزيت الأركان و السلينيوم أوضح تحسن على مستوى هذه المعايير.

الكلمات الدالة: السلينيوم، الإجهاد التاكسدي، زيت الأركان، الزئبق.

**Liste des Abréviations***A*

- AINS :** Anti-inflamatoire nonstéroïdien  
**AIS :** Anti-inflammatoire stéroïdien  
**ALAT:** Alanine amino-transferase  
**AMGI :** Acide gras mono-insaturé  
**APGI :** Acide gras poly insaturé  
**ASAT:** Aspartate aminotransferase

*C*

- CAT :** Catalase  
**CCMH :** Concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine  
**CMV :** Complexe miniro-vitaminique  
**COX :** Cyclo-oxygenase  
**Cu<sup>+2</sup> :** Cation cuivreux

*D*

- DTNB :** 5-5' dithionitrobenzoic acid  
**DICTi :** Taux initial des diènes conjugués  
**DICTm :** Taux maximal des diènes conjugués

*E*

- EDTA :** Ethylenediaminetetraacetic acid  
**ERO :** Espèces réactives de l'oxygène

*G*

- GSH-Px :** Glutathion peroxydase  
**GRase :** Glutathion reductase  
**GSH :** Glutathion réduit  
**GSH/GSSG :** Glutathion réduit/oxydé  
**GSSG :** Glutathion oxydé

**GST :** Glutathion S-transférase

*H*

**H :** Huile d'argane

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> :** Peroxyde d'hydrogène

**Hb :** Hémoglobine

**HCl :** Acide hydrochlorique

**HDL :** Lipoprotéine de haute densité (High Density Lipoprotein)

**Hg :** Mercure

**HgCl<sub>2</sub> :** Chlorure de mercure

**HSP :** Protéine de stress (Heat Shock Protein)

*I*

**IL1 :** Interleukine 1

**IL6 :** Interleukine 6

*L*

**LDL :** Lipoprotéine de basse densité (Low Density Lipoprotein)

**LOO° :** Radical peroxyde

**LOOH :** Hydroperoxyde

*M*

**MDA :** Malondialdehyde

**Mn-SOD :** Superoxyde dismutase associée au manganèse

**MTs :** Métallothionéine

*O*

**O<sub>2</sub> :** Dioxygène

**O<sub>2</sub><sup>-</sup> :** Anion superoxyde

**OH<sup>-</sup> :** Ion hydroxyde

**OH° :** Radical hydroxyle

*P*

- pH :** Potentiel d'hydrogène  
**PGE :** Prostaglandine.  
**PMN :** polynucléaires neutrophiles

*R*

- RL :** Radicaux libres  
**RO° :** Radical alkoxyde  
**ROH :** Alcool  
**ROO° :** Radical peroxyde  
**ROOH :** Hydroperoxyde  
**ROS :** Espèces réactives oxygénées (Reactive Oxygen Species)

*S*

- Se :** Sélénium  
**-SH :** Groupement sulfhydryle  
**SOD :** Superoxyde dismutase  
**SOD(Mn) :** Superoxyde dismutase à manganèse

*T*

- TBA:** Acide thiobarbiturique  
**TCA :** Trichloroacétique  
**TNF $\alpha$  :** Facteur nécrosant des tumeurs  $\alpha$   
**TXA<sub>2</sub>:** Thromboxane A<sub>2</sub>.

*V*

- VLDL :** Lipoprotéine de très basse densité (Very Low Density Lipoprotein)  
**4-HNE :** 4-hydroxynonéal  
**8-OH-dG :** 8-hydroxy-2'-désoxyguanosine

**Liste des publications**

**Necib Y, Bahi A and Zerizer S.** (2013b). Amelioration of mercuric chloride toxicity on rat liver with argan oil and sodium selenite supplements. *Int J Pharm Bio Sci.* 4(2), 839 – 849.

**Necib Y, Bahi A, Zerizer S.** (2013h). Immunomodulatory Effect of Argan oil (*Argania spinosa. L*) After Exposure to Mercuric Chloride in Mice. *Int J Pharm Sci Rev Res.* 23(1), 191-193.

**Necib Y, Bahi A, Zerizer S.** (2013a). Argan oil (*Argania Spinosa.L*) provide protection against mercueic chloride induced oxidative stress in rats albinos wistar. *Int j of Basic and App Sci.* 2(1), 73-80.

**Necib Y, Bahi A, Zerizer S.** (2013c). Protective role of sodium selenite on mercuric chloride induced oxidative and renal stress in rats. *J of stress physiol and biochem.* 9(2), 160-172.

**Bahi A, Necib Y.** (2014b). Hepatoprotective and Antioxidant Activity of Aqueous Extract of *Cyperus rotundus* Rhizome against Mercuric Chloride Induced Oxidative Stress in Rats. *Int J Pharm Sci Rev Res.* 27(1), 117-123.

**Bahi A, Necib Y.** (2014c). Protective Effect of Aqueous Extract of *Ajuga iva (L.)* against Mercury (II) induced Oxidative and Renal Stress in Rats. *Int J Pharm Sci Rev Res.* 27(1), 111-116.

**Necib Y, Bahi A, Zerizer S and Djemaizoughlache S.** (2014). Aqueous extract of *Cyperus Rotundus* rhizome protects against mercury (II) induced oxidative and renal stress in rats. *World J Pharma Res.* 3(9), 160-172.

**Bahi A, Necib Y.** (2014). Antioxidant effect of *Ajuga Iva (L.)* aqueous extract in mercuric chloride induced oxidative stress in rats. *Inter J Pharm and Bio Scie.* 6(1), 267-274.

**Bahi A, Necib Y.** (2014). Anti-inflammatory and Immunomodulatory Activities of Argan oil (*Argania Spinosa. L*) and sodium selenite after exposure to mercuric chloride in rats. *inter J Pharm Rev Res.* 29(1), 211-215.

**Les articles Acceptor**

**Bahi A, Necib Y .**(2014). In vivo restoration of hepatic and nephro protective potential of argan oil (*Argania Spinosa.L*) and sodium selenite against mercuric chloride intoxicated rats. *inter J Pharm Rev Res.* (Accepted).

**Liste des Tableaux**

<b>N°</b>	<b>Tableau</b>	<b>Page</b>
1	Récapitule les différentes séléno-enzymes, leur localisation et leur rôle, s'ils sont connus	32
2	Caractères physico-chimiques de l'huile d'argan	40
3	Pourcentage des triglycérides majeurs trouvés dans l'huile d'argan	40
4	Pourcentage des acides gras dans l'huile d'argan	41
5	Les Composés phénoliques quantifiés de l'huile d'argan	42
6	La Composition en stérols de l'huile d'argan	43
7	Les tocophérols de l'huile d'argan	43
8	Composition du régime alimentaire pour 1 kg d'aliment	49
9	Les caractéristiques physicochimiques de l'huile d'argan	57
10	dosage des Composés phénoliques dans l'huile d'argan	57
11	Activité antiradicalaire de l'huile d'argan et de sélénium vis-à-vis le DPPH	60

## Liste des figures

N°	Figure	Page
1	Schéma résume le métabolisme du mercure dans l'organisme.	2
2	Formation du transsudat et d'exsudat	8
3	Processus de migration des neutrophiles a travers les vaisseaux sanguins	9
4	La balance lymphocytaire Th1/Th2	12
5	Mécanisme d'action des AINS	16
6	Stress oxydant	18
7	Schéma modifié de l'origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqué en biologie	20
8	Réactions de la peroxydation lipidique	22
9	Nature de quelques modifications des chaînes latérales, d'acides aminés des Protéines après attaque radicalaire	23
10	Types de lésions de l'ADN provoqués par les attaques radicalaires	24
11	Régulation de la production d'espèces réactives de l'oxygène par les systèmes de défenses antioxydants	25
12	Schéma résume le mécanisme de détoxification enzymatique	26
13	L arganier dans l'Atlas	34
14	L'arganier	36
15	Photo du fruit de la graine et de l'amande de l'Arganier	36
16	Le noyau de fruit de l'arganier	37
17	1) Dépulpage du fruit, 2) concassage des noix et 3) torréfaction traditionnelle des amandons	38
18	Trituration, malaxage et pressage manuel	38
19	Les machines utilisées pour l'extraction de l'huile d'argan	39
20	Quelques composés phénoliques isolés de l'huile d'argan	42
21	Principaux stérols de l'huile d'argan	43
22	Structure des tocophérols	44
23	Schéma récapitulatif du protocole expérimental	50
24	Schéma récapitulatif du protocole expérimental de dosage de l'activité phagocytaire	51
25	Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH.	59
26	Evaluation en fonction du temps (Jours), le poids corporel (g) chez le lot témoin et les lots traités par le Se, H, Se/H, Hg, Se/Hg, H/Hg et H +Se /Hg après 21 jours de traitement.	62
27	Variation des poids relatifs du foie, des reins et de la rate chez le lot témoin et les lots traités par le Se, H, Se/H, Hg, Se/Hg, H/Hg et H +Se /Hg après 21 jours de traitement.	63
28	Variation de la concentration sérique du glucose, urée, créatinine, acide urique, bilirubine totale , bilirubine direct, protéines totale et l'albumine chez le lot témoin et les lots traités par le Se, H, Se/H, Hg, Se/Hg, H/Hg et H +Se /Hg après 21 jours de traitement.	67

29	Variation de la concentration sérique de Cholestérol, Triglycérides, Lipides totaux, DICT I, DICTmax, T Lag, Tmax et taux d'oxydation chez le lot témoin et les lots traités par le Se, H, Se/H, Hg, Se/Hg, H/Hg et H +Se /Hg après 21 jours de traitement.	73
30	Variation de l'activité enzymatique de AST, ALT, PAL et LDH chez le lot témoin et les lots traités par le Se, H, Se/H, Hg, Se/Hg, H/Hg et H +Se /Hg après 21 jours de traitement.	76
31	Variation de nombre des globule blancs (GB), des globule rouge (GR), du taux moyens d'hémoglobine (Hb), du pourcentage d'hématocrite (HT), de taux moyens du volume globulaire (VGM), la concentration corpusculaire moyen en hémoglobine (CCMH), la teneur globulaire moyen en hémoglobine (TGMH) chez le lot témoin et les lots traités par le Se, H, Se/H, Hg, Se/Hg, H/Hg et H +Se /Hg après 21 jours de traitement.	79
32	Variation de la concentration sérique de IL1, IL6 et TNF $\alpha$ chez le lot témoin et les lots traités par le Se, H, Se/H, Hg, Se/Hg, H/Hg et H +Se /Hg après 21 jours de traitement.	82
33	Variation de l'activité phagocytaire et le taux de la clairance de carbone chez le lot témoin et les lots traités par le Se, H, Se/H, Hg, Se/Hg, H/Hg et H +Se /Hg après 48 heures de traitement.	83
34	Variation de la capacité antioxydante plasmatique vis-à-vis DPPH, la concentration plasmatique des vitamines C, E et des thiols chez le lot témoin et les lots traités par le Se, H, Se/H, Hg, Se/Hg, H/Hg et H +Se /Hg après 21 jours de traitement.	86
35	variation de taux de GSH érythrocytaire, hépatique et rénale, metallothionéine hépatique et rénale et MDA érythrocytaire, plasmatique, hépatique et rénale, chez le lot témoin et les lots traités par le Se, H, Se/H, Hg, Se/Hg, H/Hg et H +Se /Hg après 21 jours de traitement.	90
36	variation de l'activité enzymatique de SOD, GPx GST et catalase érythrocytaire, hépatique et rénale chez le lot témoin et les lots traités par le Se, H, Se/H, Hg, Se/Hg, H/Hg et H +Se /Hg après 21 jours de traitement.	93
37	les coupes histologiques du foie du rat témoin (A) et traités par le Se (B), H (C), Se/H (D), Hg (E, F), Se/Hg (G), H/Hg (H) et H +Se /Hg (I) après 21 jours de traitement. Coloration a l'hématéine –éosine. (X400).	100

38	les coupes histologiques de rein du rat témoin (A) et traités par Se (B), H (C), Se/H (D), Hg (E), Se/Hg (F), H/Hg (G) et H +Se /Hg (H) après 21 jours de traitement. Coloration a l'hématéine –éosine. (X100).	102
----	---	-----

**Liste des communications**

➤ **Communication par affiche**

**Bahi A, Necib Y and Zerier S.** 1er congrès international de l'association tunisienne de physiologie et de biosurveillance de l'environnement. 19-22 Décembre 2012. Hotel EL-Mouradi, Douz, Tunisie.

**Bahi A, Necib Y and Zerier S.** 4ème journée scientifiques de l'association tunisienne de toxicology et 1ères journées de la FMT "Processus toxiques d'origines urbaines et environnementales, pathologies induites. 17-19 Mars 2013. Hotel skanes serail, Monastir, Tunisie.

**Table des matières**

Résumés

Introduction

**Partie Bibliographiques****I. Le mercure**

1. La métabolisation du mercure dans l'organisme .....	1
2. Toxicocinétique du mercure .....	2
3. L'intoxication par le mercure .....	4
4. Le mécanisme d'action du mercure.....	5
5. L'effet toxique de mercure .....	5

**II. L'inflammation**

1. Définition.....	7
2. Les types d'inflammation.....	7
2.1. L'inflammation aiguë.....	7
2.2. L'inflammation chronique.....	10
3. Les médiateurs de l'inflammation.....	10
3.1. La composante cellulaire.....	10
3.2. Les médiateurs solubles de l'inflammation.....	13
4. Anti-inflammatoires.....	15
4.1. Anti-inflammatoire non stéroïdiens.....	15
4.2. Anti-inflammatoires stéroïdiens.....	16
4.3. Anti-inflammatoires d'origine végétale.....	17

**III. Le stress oxydant**

1. Définition.....	18
2. Les espèces réactives de l'oxygène.....	19
3. Les cibles biologiques du stress oxydant.....	20
3.1. Les lipides.....	21
3.2. Les protéines.....	22
3.3. Les acides nucléiques.....	23
4. Le stress oxydant et les pathologies.....	25
5. Systèmes de défenses antioxydants.....	25
5.1. Les systèmes enzymatiques.....	26

5.2. Les systèmes antioxydants non enzymatiques.....	27
<b>IV. L'huile d'argan</b>	
1. L'arganier.....	34
1.1. Aspect historique.....	34
1.2. Répartition géographique.....	34
1.3. La classification botanique.....	35
1.4. La Botanique de l'arganier.....	35
2. L'huile d'argan.....	37
2.1. Extraction de l'huile d'argan.....	37
2.1.1. Extraction artisanale.....	38
2.1.2. Extraction par la presse mécanique.....	38
2.1.3. Extraction par les solvants organiques.....	39
2.2. La Phytochimie de l'huile d'argane.....	39
2.2.1. Les Caractéristiques physico-chimiques.....	39
2.2.2. La Composition de l'huile d'argan.....	40
2.3. Intérêts thérapeutiques de l'huile d'argan.....	44

## Partie Pratique

### Matériels et Méthodes

1. Matériels et méthodes des tests phytochimiques.....	46
1.1. Matériel végétale.....	46
1.2. Les Caractéristiques physico-chimiques.....	46
1.3. Dosage des composés phénoliques.....	47
1.4. Dosage des flavonoides.....	47
1.5. Dosage des tanins.....	48
1.6. Effet scavenger du radical DPPH in vitro.....	48
2. Matériels et méthodes des tests biologiques.....	48
2.1. Matériel biologique et conditions d'élevage.....	48
2.2. Traitement des rats.....	49
2.3. Les Méthodes de dosage.....	52
2.3.1. Dosage des paramètres biochimiques.....	52
et hématologiques	
2.3.2. Oxydation in vitro des lipoprotéines et dosage.....	52

des diènes conjugués	
2.3.3. Dosage des paramètres immunologiques.....	52
• Dosage des Interleukines 1 (IL-1) .....	52
• Dosage des Interleukines 6 (IL-6).....	53
• Dosage de Facteur nécrosant des tumeurs $\alpha$ (TNF $\alpha$ ).....	53
• Dosage de l'activité phagocytaire.....	53
2.3.4. Dosage de MDA plasmatique .....	53
2.3.5. Evaluation de la capacité antioxydante plasmatique.....	53
• Dosage de la vitamine C.....	53
• Dosage de la vitamine E.....	54
• Dosage des thiols plasmatique.....	54
• Dosage de radical DPPH in vivo.....	54
2.3.5. Dosage de quelques paramètres du stress.....	54
oxydant tissulaire et érythrocytaire	
• Préparation de l'homogénat.....	54
• Dosage du glutathion tissulaire.....	55
• Dosage de malondialdéhyde (MDA).....	55
• Dosage de la métallothionéine.....	55
• Dosage de l'activité de SOD.....	55
• Dosage de la glutathion peroxydase (GSH-Px).....	55
• Dosage de la glutathion-S-transferase (GSTs).....	55
• Dosage de la catalase.....	56
• Dosage des protéines tissulaire.....	56
et érythrocytaire	
2.3.6. L'étude histologique .....	56
2.4. Analyse statistique.....	56

## Résultats et Discussion

1. Résultats des tests phytochimiques.....	57
1.1. Les caractéristiques physicochimiques et dosage des .....	57
Composés phénoliques de l'huile d'argan	
1.2. L'activité antiradicalaire vis-à-vis de DPPH de l'huile d'argan et de.....	59
sélénium	

2. Résultats des tests biologiques .....	62
2.1. Influence du traitement sur les variations du poids corporel.....	62
et pondérales des organes	
2.2. Influence du traitement sur les variations des paramètres.....	65
biochimiques sériques	
2.3. Influence du traitement sur les variations des paramètres.....	71
lipidiques sérique	
2.4. Influence du traitement sur les variations de l'activité sérique.....	76
de quelque marqueur enzymatique	
2.5. Influence du traitement sur les variations des paramètres.....	78
hématologiques	
2.6. Influence du traitement sur les variations des paramètres.....	81
immunologiques	
2.7. Influence du traitement sur la capacité antioxydante.....	85
plasmatique	
2.8. Influence du traitement sur les variations des paramètres.....	88
du stress oxydant	
2.9. Influence du traitement sur les variations histologiques.....	98
Conclusion et perspectives.....	104
Références bibliographiques.....	106
Annexes.....	127





## Introduction

Aujourd'hui la pollution par les métaux lourds, dans les pays développés et en voie de développement, est un problème majeur pour le XXIème siècle.

L'incinération des déchets ménagers, quelque soit son ancienneté et sa technologie, émet cependant des substances dont la toxicité est plus ou moins bien établie. Elles peuvent être présentes dans les matériaux originaux ou bien créés lors du processus d'incinération. Les principaux composants de ces émissions sont les dioxines, les poussières et les métaux lourds.

Le mercure est un métal lourd largement utilisé dans les activités métallurgiques dès l'antiquité et redécouvert au moment de la révolution industrielle.

Les sources d'exposition au mercure sont nombreuses : les sources d'exposition non professionnelle (l'air, les aliments, l'eau potable) et professionnelle, c'est d'abord l'existence d'intoxications massives chez les travailleurs professionnellement exposés au mercure qui a attiré l'attention sur les effets délétères de ce toxique sur l'organisme humain et sur les conséquences organiques graves (Nogueira *et al.*, 2003a).

Le mercure pénètre essentiellement dans l'organisme par voie digestive et pulmonaire. Le mercure est d'abord transporté par le sang ou l'on peut le doser facilement. Il s'accumule principalement dans le foie, les reins, les poumons et le cerveau (Agarwal *et al.*, 2007).

Le mercure modifie la biologie de la cellule en perturbant de nombreuses voies métaboliques et différents processus physiologiques. Certaines études suggèrent que le mercure, même à des niveaux faibles, pourrait exercer un effet délétère sur la fonction rénale, et peut entraîner une nécrose hépatique (Deepmala *et al.*, 2013). La lutte contre les radicaux libres fait appel à des systèmes non enzymatiques piégeant les radicaux libres et à des systèmes enzymatiques (Rakotovao, 2008).

Les oligo-éléments antioxydants sont des cofacteurs de ces enzymes : le cuivre, le zinc, et le sélénium qui joue un rôle important dans plusieurs processus biologiques pour les êtres humains et beaucoup d'autres formes de vie (Galan *et al.*, 1997). Il est important dans la protection contre les radicaux libres. Le sélénium joue un rôle fondamental dans le système de Protection cellulaire. En effet, le statut en sélénium est corrélé à la capacité antioxydant tissulaire (Brigelius-Flohe *et coll.*, 2003). Et il permet de maintenir une concentration élevée de glutathion peroxydase riches en fonction SH, qui intervient dans la protection vis-à-vis les radicaux libres.

Plusieurs recherches s'orientent vers les plantes médicinales considérées comme source énorme de multiples substances phytothérapeutiques douées d'activités à la fois anti-

inflammatoire et anti-oxydantes et qui peuvent être l'arme permettant de faire face au stress oxydant et ses dégâts au niveau des organes de l'être vivant.

La présente étude a été réalisée pour évaluer l'effet de certains antioxydants sur quelques paramètres du stress oxydant et les dommages qu'il peut provoquer au niveau du Foie et des reins pendant le stress oxydatif au mercure. Nous avons utilisé comme source d'antioxydants, le sélénium (oligo-élément) et l'huile d'argan extraite par la méthode artisanale de la plante (*Argania Spisosa. L*), espèce endémique, répandue dans le Sahara algérien et connue sous le nom de «Argan». Cette huile n'a été jamais étudiée en Algérie sur la toxicité du mercure, raison pour laquelle nous avons fixé les objectifs suivants :

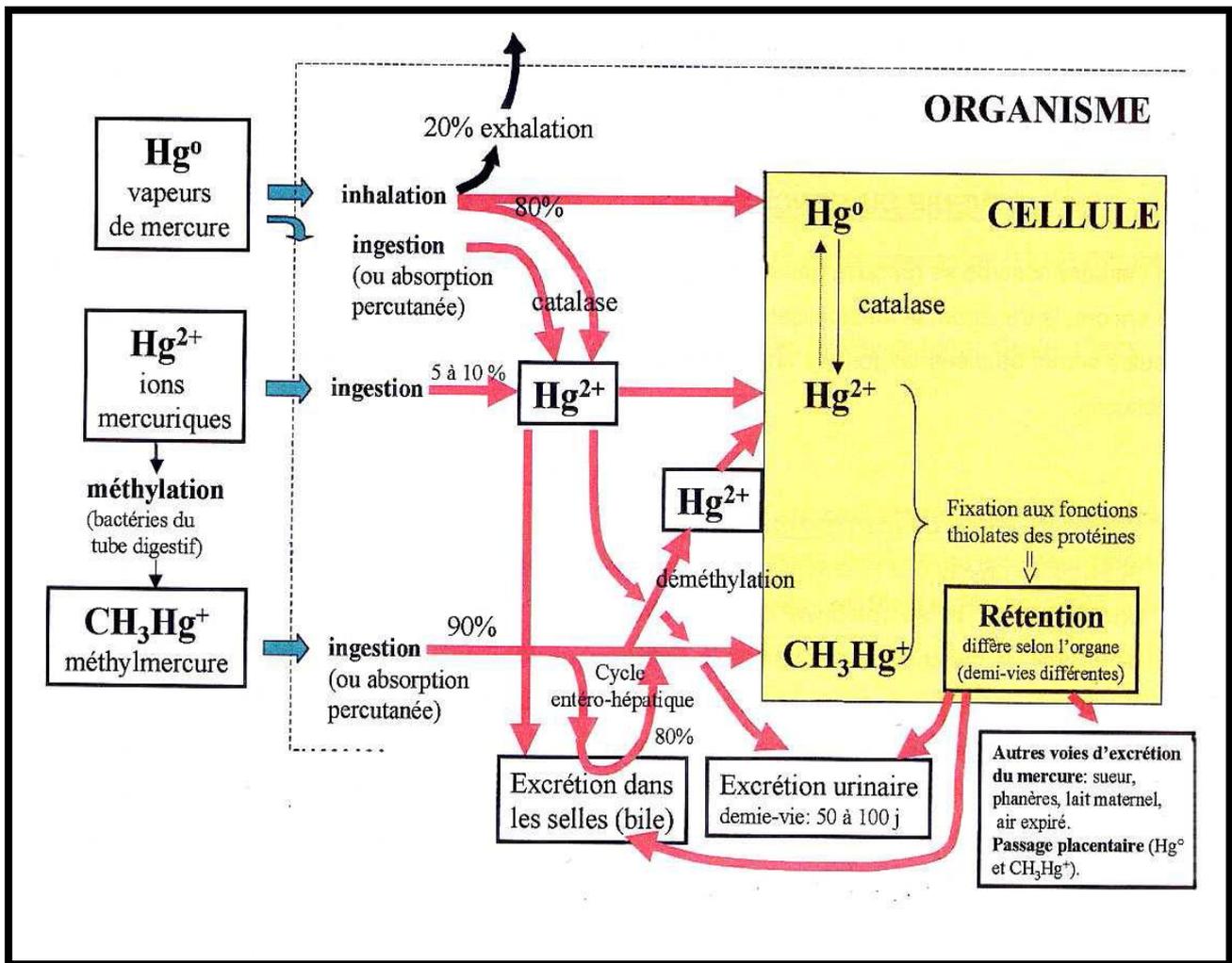
- Etudes phytochimique de l'huile d'argan pour avoir quelques informations concernant ses constituants et son activité biologique.
- Des tests préliminaires concernant son activité antioxydante in vitro.
- Etudes de son activité antioxydante in vivo en utilisant un modèle animal traité par le mercure.
- Evaluation des différents paramètres biochimiques, hématologiques et immunologiques concernant les perturbations métaboliques et quelques paramètres du stress oxydant selon les moyens disponibles au niveau du foie et des reins.
- Une étude histologique sur les organes déjà cités pour maître en évidence d'une part l'effet du stress oxydant associé au mercure et d'une autre part l'efficacité de l'huile et de sélénium utilisé comme source d'antioxydants contre les dommages du stress oxydant, et donc par conséquence contre le développement des complications associées au stress oxydatif induit par le mercure par le biais du stress oxydant.

## I. Le Mercure

### 1. Le métabolisme du mercure dans l'organisme

Le mercure se trouve en sous trois cas : vapeurs de mercure  $Hg^{\circ}$ , ions mercuriques  $Hg^{+2}$  qui sont libre ou liés au moyen de bactéries du tube digestif, ils se transforment en  $CH_3Hg^+$ . Ce qui concerne  $Hg^{\circ}$  il entre dans l'organisme, quelque soit par l'inhalation ou bien par l'ingestion en sachant que le pourcentage du  $Hg^{\circ}$  qui entré déjà dans l'organisme est 100% ce pourcentage est partagé en sous deux causalités : le premier taux est 20% qui subi une exhalation, la partie qui reste lui même sera partagé en deux situation la premier entre dans la cellule et se transforme en  $Hg^{+2}$  grâce à l'enzyme qui s'appelle la catalase. A propre de  $Hg^{+2}$  à partir de 5% à 10% il pénètre vers l'organisme par l'ingestion et puis une partie entre dans la cellule, partie fait l'excrétion dans les selles (bile) et l'autre partie fait l'excrétion urinaire, cette opération dure demi-vie de 50 à 100 jours (Jean Jacques Melet, 2000).

$CH_3Hg^+$  : pénètre l'organisme par l'ingestion, il contient 90% du  $Hg^{+2}$ , le reste pénètre la cellule directement, une partie fait l'excrétion des déchets dures, partie excrète dans l'appareil urinaire par le cycle entéro-hépatique et va revenir à la cellule. Dans la cellule  $CH_3Hg^+$  et  $Hg^{+2}$  se fixe aux fonctions de thiolates des protéines et subi une rétention puis l'excrétion. Le schéma suivant résume le métabolisme du mercure dans l'organisme :



**Figure 01:** Schéma résume le métabolisme du mercure dans l'organisme.

(Jean Jacques Melet, 2000)

## 2. La Toxicocinétique du mercure

L'absorption, la distribution et le stockage du mercure dans l'organisme sont liés à l'espèce chimique en cause et aux propriétés physicochimiques des composés, en particulier de leur solubilité. On différencie pour cette raison le devenir du mercure chez l'homme pour les différents composés : le mercure métallique, inorganique et le mercure organique (Bensefa *et al.*, 2011).

## **2.1. Le Mercure organique**

### **2.1.1. L'absorption du mercure organique**

Trois voies d'absorption du mercure organique sont possibles (pulmonaire, cutanée et digestive), En milieu professionnel, l'absorption pulmonaire est de l'ordre de 60% et est la plus fréquente surtout vis-à-vis des dérivés alkylés les plus volatils, il passe facilement la barrière cutanée. En population générale, l'exposition au mercure organique est principalement digestive par exemple d'aliments contaminés (poissons) (Lauwerys *et al.*, 2007 ; Haufroid *et al.*, 2007)

### **2.1.2. Le Transport et La distribution du mercure organique**

Dans la circulation sanguine, le mercure organique se fixe principalement sur les groupements thiol des globules rouges ou forme un complexe hydrosoluble en se fixant sur les groupements thiol d'un ligand (Clarkson, 2002). le methyl de mercure passe facilement la barrière hémato encéphalique par le biais d'un transport actif ( Kerper *et al.*,1996 ) et une fois dans le cerveau devient moins échangeable que dans les autres organes ( Lauwerys *et al.*,2007 ).Dans le système nerveux central (SNC), le mercure se localise dans la substance grise ( PNUE, 2002).

### **2.1.3. L'excrétion du mercure organique**

L'élimination du mercure organique est principalement biliaire. Il subit dans l'intestin un cycle entéro-hépatique avec réabsorption portale. Cette excrétion peut être stimulée par l'administration de résines thiolées fixant le mercure (Clarkson, 2002).

## **2.2. Le Mercure inorganique**

### **2.2.1. L'Absorption du mercure inorganique**

Sous forme de vapeur, le mercure élémentaire est rapidement et essentiellement absorbé par voie pulmonaire. Le taux d'absorption alvéolaire étant classiquement évalué à 80% (Lauwerys *et al.*, 2007).

Par voie cutanée, le taux d'absorption du mercure métallique sous forme vapeur est faible, évalué à moins de 3% La pénétration sous-cutanée du mercure métallique est une voie accidentelle régulièrement décrite chez des infirmières par blessures suite au bris de thermomètres à mercure (Haufroid *et al.*,2007). En revanche, plusieurs observations ont

montré des intoxications avec syndrome néphrotique par passage transdermique lors de l'application cutanée de crème ou savon éclaircissant contenant des sels de mercure inorganique. Le taux d'absorption digestive des dérivés inorganiques, tels que le chlorure mercurique, suite à l'ingestion volontaire ou accidentelle peut aller jusqu'à 15%, et peut être à l'origine d'une intoxication aiguë (Lauwerys *et al.*, 2007).

### **2.2.2. Le Transport et la distribution du mercure inorganique**

Le mercure élémentaire après absorption, distribué rapidement dans tous les organes. Le mercure inorganique se distribue de façon identique dans tous les organes. L'accumulation des dérivés inorganiques dans le rein et le foetus est plus faible que le mercure métallique, ce dernier étant plus lipophile. Les ions mercuriques formés se fixent sur les protéines plasmatiques et sont rapidement distribués dans le foie et le rein. Dans les cellules, il s'accumule dans les lysosomes, les mitochondries et les membranes cellulaires. Une partie importante du mercure inorganique se fixe sur une protéine aux propriétés similaires à la métallothionéine (MT), cette dernière joue un rôle protecteur en inhibant l'action toxique du mercure. (Lauwerys *et al.*, 2007).

### **2.2.3. L'excrétion du mercure inorganique**

L'élimination de l'Hg<sup>0</sup> ou mercure inorganique est principalement rénale lors d'exposition prolongée, dans une moindre mesure, elle peut être biliaire (jusqu'à 40%), et plus faible par voie cutanée et salivaire ou dans les phanères (Lauwerys *et al.*, 2007), Le mercure inorganique est excrété sous forme ionisée ou fixée à des protéines ( Sundberg *et al.*, 1999).

## **3. L'intoxication par le mercure**

### **3.1. L'intoxication aiguë**

L'ingestion accidentelle ou volontaire de mercure métallique ne provoque pas d'intoxication, parce qu'il est très peu absorbé, mais peut se compliquer d'une fausse route et entraîner une inhalation avec une atteinte pulmonaire. Les intoxications aiguës par ingestion publiées sont essentiellement liées à l'ingestion volontaire ou accidentelle de chlorure mercurique. Des douleurs abdominales, des vomissements sanglants, voire même des perforations digestives ont été observés (Garnier, 2000).

### 3.2. L'Intoxication chronique

Chez l'homme, les deux principaux organes cibles du mercure élémentaire et du mercure inorganique sont le système nerveux central et le rein. Ainsi, les principaux symptômes d'hydrargyrisme chronique (intoxication par le mercure) sont d'ordre neurologique comme des troubles de la psychomotricité, des troubles cognitifs et des modifications de la personnalité (comme de l'irritabilité, de l'anxiété). Le mercure atteint également les reins (lésions glomérulaires et tubulaires) et induit une protéinurie. Enfin, il est également observé des troubles cardiovasculaires (tachycardie, hypertension artérielle), respiratoires, hépatiques et immunologiques. Le mercure organique atteint essentiellement le cerveau, avec des paresthésies, un malaise général, des modifications et des troubles sensoriels. Le méthylmercure induit la maladie de Minamata avec l'apparition de troubles neurologiques sévères. Le mercure organique provoque également des atteintes rénales. Les mêmes observations sont faites chez l'animal, et les organes cibles sont les mêmes (INERIS, 2010).

### 4. Le mécanisme d'action du mercure

L'activité cytotoxique du mercure est liée d'une part à sa grande affinité pour le soufre, entraînant le blocage des fonctions thiol (-S-H) des protéines (modifiant ainsi leur structure tertiaire et quaternaire), des peptides (glutathion) ou des acides aminés soufrés (cystéine). Les protéines ainsi inactivées peuvent être des enzymes, des protéines des membranes cellulaires (notamment des récepteurs d'hormones et de neuromédiateurs), des protéines membranaires des organites cellulaires (mitochondries, lysosomes), des protéines membranaires impliquées dans les transports ioniques (ATPase Na-K, canaux calciques) ou encore la tubuline et la myéline, ce qui provoque de graves perturbations dans la conduction de l'influx nerveux (Olivieri *et al.*, 2000).

### 5. L'effet toxique du mercure

#### 5.1. L'effet de mercure sur les reins

Le mercure ionisé  $\text{Hg}^{2+}$  va s'accumuler au niveau des tubules proximaux du rein et la zone superficielle de la médullaire externe. Lors de fortes expositions au mercure élémentaire ou inorganique, des tubulopathies dose-dépendantes et des glomérulonéphrites à dépôts extra-membraneux de mécanisme immunotoxique sont observées (Hua, 1993). Les atteintes tubulaires semblent survenir au-delà d'un certain seuil d'exposition, classiquement lorsque l'excrétion urinaire du Hg dépasse  $50 \mu\text{g/g}$  de créatinine (Testud, 2005).

## **5.2. L'effet de mercure sur le foie**

La cytolyse hépatique est un signe d'intoxication aigue par le mercure (Necib *et al.*, 2013). Elle ne s'observe qu'après des contaminations massives. Le mercure inhibe la synthèse des hémoprotéines, et en particulier celle du cytochrome P450, ce qui peut être à l'origine d'interactions médicamenteuses et d'effet toxiques d'autres substances.

## **II. L'inflammation**

### **1. Définition**

La réponse inflammatoire est une réponse adaptative engendrée en réponse à des stimuli nocifs telle qu'une infection ou une agression tissulaire. Elle nécessite une régulation fine, généralement bénéfique, elle conduit à l'élimination d'éventuels pathogènes et au retour à l'homéostasie du tissu lésé. Une régulation défectueuse peut engendrer des dommages irréversibles. Une réponse insuffisante conduit à une immunodéficience pouvant entraîner une infection secondaire ou même un cancer. Exacerbée, au contraire, elle augmente la morbidité et la mortalité dans des pathologies comme l'arthrite rhumatoïde, la maladie de Crohn ou encore le diabète. Mal contrôlée, l'inflammation peut s'étendre au reste de l'organisme *via* la circulation sanguine. Elle peut alors conduire à des dommages tissulaires irréversibles locaux ou généralisés, parfois à un choc septique entraînant dans les cas les plus graves le décès (Nathan, 2002; Barton, 2008).

La réponse inflammatoire se déroule en quatre étapes : la reconnaissance des signaux de danger, le recrutement de cellules sur le site d'infection, l'élimination du pathogène et la résolution de l'inflammation conduisant à un retour à l'homéostasie et à la cicatrisation du tissu lésé, en absence d'une résolution, s'installe une inflammation chronique (Barton, 2008).

### **2. Les types d'inflammation**

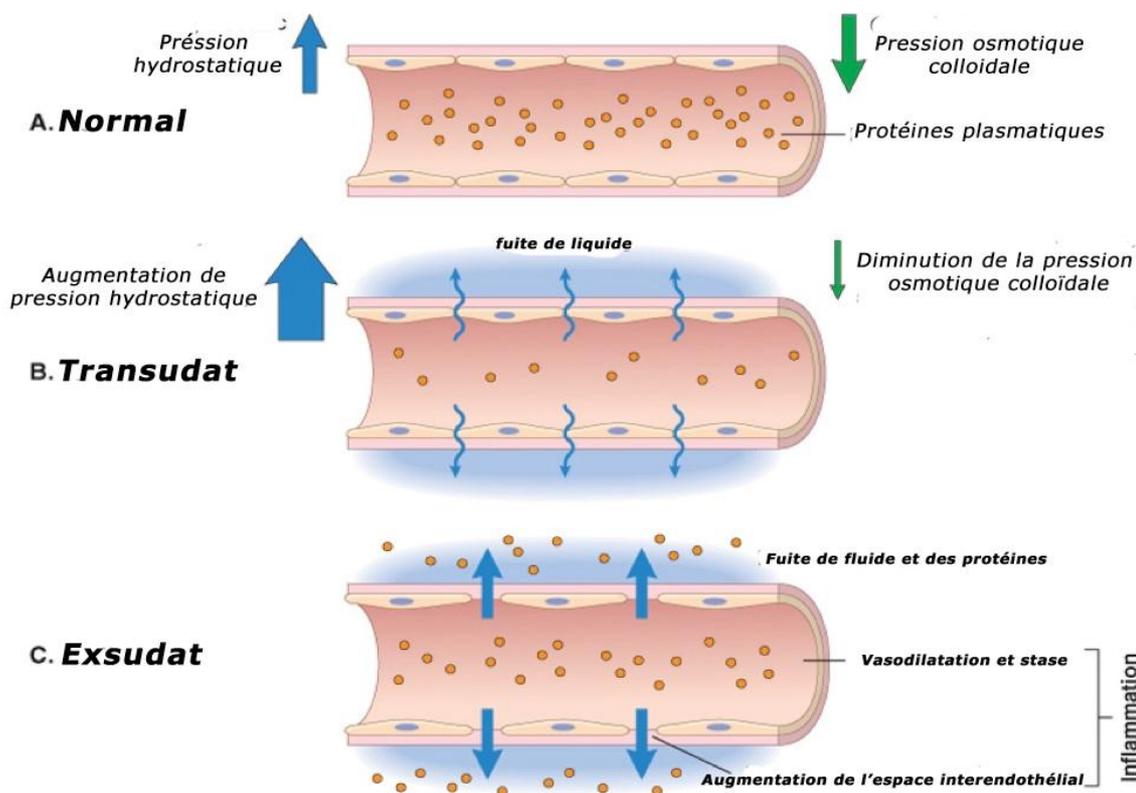
#### **2.1. L'inflammation aigue**

L'inflammation aigue se constitue en trois phases :

##### **2.1.1. La Phase vasculaire**

Il s'agit d'une vasoconstriction artériolaire, très brève de quelques secondes. Elle est due à l'action du système sympathique, et est très rapidement ressentie puisque douloureuse, expliquée par la libération d'histamine, de sérotonine et de kinine, l'excitabilité des terminaisons nerveuses en est la conséquence et va conforter le processus douloureux. Cette constriction n'est pas innocente sur les plaquettes présentes dans la circulation, laquelle est perturbée. Ces plaquettes vont alors s'activer. Très vite à cette vasoconstriction, va faire suite une vasodilatation des vaisseaux sanguins. Le débit local est augmenté et la perméabilité des capillaires est exacerbée, ce qui explique l'extravasation des cellules sanguines (diapedese) (figure 04). Ce qui explique en partie la constitution de la chaleur et de la rougeur. La

migration des cellules s'accompagne d'un transfert de plasma qui crée l'œdème (Kumar *et al.*, 2007).



**Figure 02:** Formation du transsudat et d'exsudat (Kumar *et al.*, 2007).

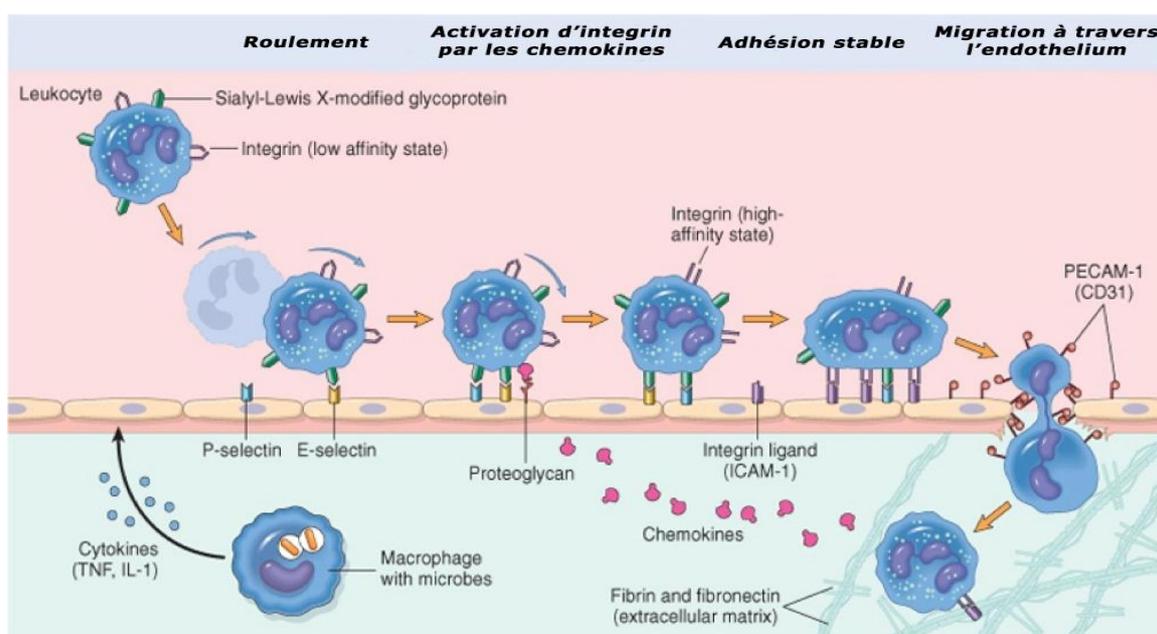
### 2.1.2. La Phase cellulaire (recrutement des leucocytes)

Les phénomènes vasculo-exsudatifs initiaux permettent l'arrivée dans le foyer inflammatoire des leucocytes. Les premiers sur place (environ 6 heures) sont les polynucléaires. Le plus souvent, les polynucléaires sont progressivement remplacés sur le site inflammatoire par les cellules monocytes. Parmi celles-ci, les macrophages ont pour fonction d'assurer la détergence grâce à leur capacité de phagocytose. Il s'y associe des lymphocytes et des plasmocytes qui participent à la réponse immune spécifique de l'antigène (Nathan, 2002). L'afflux des cellules, fait que celles-ci vont d'abord se marginaliser sur le site de l'agression en environ 30 minutes. C'est à ce moment qu'on pourra constater « in situ » la présence de polynucléaires neutrophiles, lesquelles sont plaqués le long des cellules endothéliales de l'endroit concerné. Ces cellules vont traverser la paroi, grâce à de nombreux facteurs attractants comme l'IL8. Ces cellules vont en effet ingérer les éléments lésés. Cette fonction n'est pas simple. Elle repose sur la dégranulation des composants internes de la cellule. Ceci

conduit à la sécrétion des protéases (élastase et collagénase), et la libération des radicaux libres. Les PMNs vont contribuer à l'éradication des corps étrangers (s'il y a lieu) ou des tissus lésés (en cas de traumatisme par exemple). Dans ce type de situation, la réaction va s'arrêter mais ceci n'est pas toujours le cas et les macrophages dont le pouvoir phagocytaire est important, vont intervenir. Ceci constitue le passage de la réaction inflammatoire proprement dite à la réaction immunitaire et la mise en place des processus inhérents (Charles *et al.*, 2010).

### 2.1.3. La Phase de résolution

La phase de résolution, dite de réparation, dépend du degré des lésions tissulaires. En effet, dans les conditions les plus favorables, les agents agresseurs sont éliminés par les PMNs, et les produits de dégradation ainsi que les débris cellulaire sont phagocytés par les macrophages (figure 05). Les macrophages vont alors sécréter des cytokines et des médiateurs qui vont induire la phase de cicatrisation et de régénération tissulaire. Le retour à un état physiologique consiste dans un premier temps en la réparation de l'endothélium par les cellules endothéliales elles-mêmes. Les macrophages vont participer à l'angiogenèse, mais ce sont surtout les fibrocytes puis les fibroblastes qui vont produire les protéines matricielles des tissus intercellulaires, comme le collagène, la fibronectine et la laminine pour permettre la reconstruction des tissus. Le système de l'angiogenèse est ainsi remis au repos et la réaction inflammatoire peut s'éteindre (Weill *et al.*, 2003).



**Figure 03 :** Processus de migration des neutrophiles à travers les vaisseaux sanguins (Kumar *et al.*, 2007).

## 2.2. L'inflammation chronique

Morphologiquement, l'inflammation chronique est définie par la présence de lymphocytes, macrophages, et plasmocytes dans les tissus. Dans de nombreux cas, la réponse inflammatoire chronique peut persister pendant de longues périodes (plusieurs mois ou années). Elle est considérée comme être causé par l'engagement persistant des réponses de l'immunité innée et acquise, comme dans la polyarthrite rhumatoïde. Il est prouvé que les macrophages dans ces lésions produisent une série de médiateurs pro-inflammatoires qui activent les fibroblastes pour fixer le collagène et activer les autres macrophages et lymphocytes pour libérer des médiateurs responsables des réponses inflammatoires. L'inflammation chronique est initialement déclenchée par des réponses vasculaires qui impliquent l'apparition de molécules d'adhésion sur la surface des cellules endothéliales qui vont spécifiquement entraîner l'adhésion des lymphocytes et des monocytes, et permettent leur transmigration dans le compartiment extravasculaire (Charles *et al.*, 2010). Tout comme dans la réponse inflammatoire aiguë, les lymphocytes et les monocytes, subissent un processus d'activation qui favorisent l'adhérence et la transmigration de ces cellules dans le compartiment extravasculaire. En tout type de réponse inflammatoire, les différences entre les types de molécules d'adhésion exprimées sur les cellules endothéliales détermineront le type de leucocytes qui migrent (Nourshargh *et al.*, 2006; Charles *et al.*, 2010).

## 3. Les médiateurs de l'inflammation

Cette partie introduit les principaux médiateurs cellulaires et moléculaires de l'inflammation. Les acteurs, dont le rôle dans la pathogénie des maladies inflammatoires chroniques est connu, y sont particulièrement mis en relief (Russo-Marie *et al.*, 1998).

### 3.1. La composante cellulaire

A l'exception des cellules endothéliales, toutes les cellules participant à la réponse inflammatoire et immunitaire ont pour origine des cellules souches de la moelle épinière. Ces dernières se différencient au niveau médullaire sous l'effet de cytokines et de facteurs de croissance particuliers avant d'être libérées dans la circulation générale.

#### a) Les granulocytes

Les granulocytes sont les cellules les plus nombreuses dans le sang périphérique. Ils regroupent les polynucléaires neutrophiles (PNN), éosinophiles et basophiles. Les PPN jouent

essentiellement deux rôles : la phagocytose des éléments étrangers et la dégranulation. La phagocytose est l'ensemble des processus par lesquels la cellule englobe, dans une vacuole hydrolytique lysosomale, une structure figurée étrangère et/ou délétère. Les PPN sont également capables de synthétiser un grand nombre de médiateurs inflammatoires lipidiques [leucotriènes (LT) et prostaglandines (PG)], et cytokiniques [les interleukines IL-1 $\beta$  et IL-6 ou le Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )] (Russo-Marie *et al.*, 1998).

### **b) Les monocytes et les macrophages**

Les monocytes représentent 2 à 10 % des leucocytes. Ce sont des cellules jeunes qui possèdent toutes les activités migratoires, chimiotactiques, phagocytaires et sécrétoires nécessaires à leur fonction. A terme, ils migrent dans les tissus où ils se différencient en macrophages tissulaires multifonctionnels.

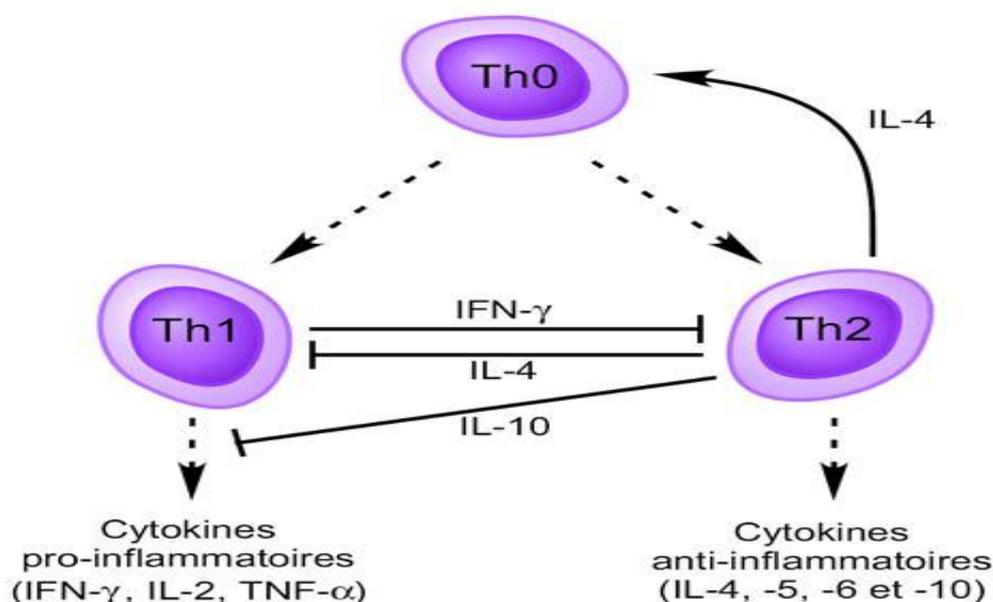
Les monocytes et macrophages sont des cellules phagocytaires. Ils libèrent des espèces réactives de l'oxygène, des enzymes hydrolytiques ou des protéases qui contribuent à la destruction d'éléments étrangers. Ils interviennent particulièrement dans l'amplification de l'inflammation par une libération massive de cytokines inflammatoires (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12), de facteurs chimiotactiques (IL-8), de prostaglandines ou de leucotriènes (essentiellement PGE2 et LTB4) qui contribuent au recrutement et à l'activation d'autres cellules immunitaires. Par une libération plus tardive de cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10, ils contribuent à rétablir l'homéostasie au niveau du foyer inflammatoire. Les monocytes sont considérés comme les cellules pivots de l'inflammation chronique. Ils jouent un rôle prépondérant dans la destruction tissulaire et l'entretien du processus inflammatoire.

Les macrophages sont des cellules différenciées des monocytes, eux même dérivés des cellules de la moelle osseuse. Ce sont des cellules hétérogènes, du fait des mécanismes qui gouvernent leur différenciation, mais aussi du fait de leur distribution dans les tissus et leur capacité de réponse à un stimulus (Gordon, 2003; Russell, 2007).

Les macrophages polarisés sont classés en deux groupes : les macrophages M1 et les macrophages M2. Les macrophages M1 sont classiquement décrits comme répondant à deux types de signaux : les cytokines de type Th1 de l'inflammation (IL-1, IL-2, TNF- $\alpha$ , IL-12) et des composés microbiens. Ils induisent une réponse de type cellulaire, à tendance pro-inflammatoire et sont bactéricides (Ma *et al.*, 2003). Les macrophages M2 jouent quand à eux un rôle important dans l'inflammation et produisent des médiateurs anti-inflammatoires jouant un rôle d'immuno-modulateur. Au contraire du type M1, ils sont très peu bactéricides et activé par les cytokines de type Th2 (Ma *et al.*, 2003).

### c) Les lymphocytes

Il existe deux populations de lymphocytes (B et T) dont les rôles sont fondamentalement différents. Les lymphocytes B sont essentiellement impliqués dans la synthèse d'anticorps et dans l'immunité spécifique. Les précurseurs des lymphocytes T donnent naissance à des lymphocytes CD4 (régulateurs) et CD8 (cytotoxiques ou suppresseurs). Les lymphocytes CD8 exercent des fonctions cytotoxiques qui leur permettent d'éliminer les cellules infectées par les pathogènes intracellulaires. Ils libèrent essentiellement de l'IFN- $\gamma$  et du TNF- $\alpha$ . Leur implication dans les maladies inflammatoires est mal connue, et semble a priori mineur. Les lymphocytes CD4 jouent en revanche un rôle régulateur majeur dans la réponse immunitaire et inflammatoire par la libération de cytokines spécifiques. Différentes sous populations de lymphocytes T ont été identifiées : les cellules T helper précurseurs (Thp) qui se différencient, selon l'environnement cytokinique, en cellules de type Th1 avec un profil de sécrétion pro-inflammatoire (IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ), Th2 avec un profil anti-inflammatoire (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10) ou Th3 (encore appelées Tr1 ou lymphocytes T régulateur). Les cellules Th1 et Th2 produisent des cytokines qui inhibent mutuellement l'activité et la prolifération de l'autre type cellulaire, définissant une « balance Th1/Th2 » (figure 04). Au niveau pathologique, un déséquilibre orienté vers un type cellulaire Th1 ou Th2 a été mis en évidence dans la plupart des maladies inflammatoires chroniques. La balance lymphocytaire pourrait constituer l'une des cibles d'intervention thérapeutique (Koshino *et al.*, 1996).



**Figure 04** : La balance lymphocytaire Th1/Th2 (Koshino *et al.*, 1996).

### 3.2. Les médiateurs solubles de l'inflammation

#### a) Les médiateurs lipidiques de l'inflammation

Sous ce terme sont regroupés tous les produits terminaux du métabolisme de l'acide arachidonique, principalement les prostaglandines, les leucotriènes. Cette voie métabolique est essentiellement catalysée par la phospholipase A2 (PLA2) de type IV, une enzyme permettant la libération de l'acide arachidonique à partir des lipides membranaires. Deux voies enzymatiques principales divergent ensuite pour conduire, à partir de l'acide arachidonique, à la formation de médiateurs lipidiques de l'inflammation biologiquement actifs : la voie des cyclooxygénases (COX) et celles des lipoxygénases. L'activité COX conduit à la formation de prostaglandine (PG) et thromboxane (TX). Ces médiateurs sont essentiellement libérés, à des niveaux variables selon l'appareil enzymatique disponible, par les cellules endothéliales, les macrophages, les mastocytes, les plaquettes et les fibroblastes. Les leucotriènes (LT) sont synthétisés par des réactions catalysées par les lipoxygénases. La 5-lipoxygénase est une enzyme dont la distribution est limitée à certaines cellules d'origine médullaire, aux PNN, éosinophiles, basophiles, aux monocytes / macrophages, mastocytes et lymphocytes B (Russo-Marie *et al.*, 1998).

#### a) Les cytokines

Les cytokines constituent une famille de médiateurs pro-inflammatoires et immunorégulateurs, sécrétées principalement par les cellules effectrices du système immunitaire. Seuls le TNF- $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor) et les interleukines IL-1 $\beta$ , IL-6 et IL-8, jouent vraisemblablement un rôle majeur dans la plupart des maladies inflammatoires (Baulig, 2004b).

- **L'interleukine 1**

C'est une cytokine de 159 acides aminés (AA) ou 153 AA (17 kDa) (forme mature) suivant que l'on considère sa forme moléculaire  $\alpha$  ou  $\beta$ . L'homologie de ces deux formes au niveau de leur séquence d'AA est assez faible (26 %). Cependant, malgré cette faible homologie de séquence, l'IL-1 $\alpha$  et l'IL-1 $\beta$  se lient aux mêmes récepteurs. L'IL-1 est sécrétée par les macrophages mais aussi par les neutrophiles, les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses et les lymphocytes T et B. Elle est sécrétée en réponse à différents stimuli

tels que : le TNF- $\alpha$ , IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , les LPS (Lipopolysaccharides), des virus et tout autre antigène. C'est un médiateur incontournable de la réponse immunitaire et de l'inflammation : adhésion des monocytes et neutrophiles, chimio-attracteur des leucocytes, activation des cellules T helper, prolifération des lymphocytes B, etc. Son effet principal est d'induire la cyclo-oxygénase 2 (COX-2) qui converti l'acide arachidonique des membranes cellulaires en prostaglandines directement impliquées dans le processus inflammatoire (phase aiguë de l'inflammation), c'est une cytokine précoce de la réponse immunitaire face à une agression. L'IL-1 est aussi un puissant inducteur de la production d'un grand nombre de cytokines par différentes cellules. De ce fait, un certain nombre de ses activités biologiques sont vraisemblablement indirectes et résultent de l'effet d'autres cytokines (Dinarello, 1994, 1996, 2002).

- **Le facteur nécrosant des tumeurs  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )**

C'est une cytokine de 157 AA (17 kDa). Le TNF- $\alpha$  est libéré principalement par les leucocytes et les lymphocytes T activés mais aussi dans une moindre mesure par les cellules endo- et épithéliales. Il possède plusieurs actions pro-inflammatoires sur divers organes et systèmes, généralement en coopération avec l'IL-1 et l'IL-6 : sur le foie, stimulation de la phase de réponse aiguë de l'inflammation qui provoque notamment l'augmentation de la concentration en protéine C réactive. Ce sont des protéines qui permettent notamment d'opsoniser les antigènes en vue de leur phagocytose et donc de recruter les neutrophiles, sur les macrophages en stimulant la phagocytose. Une activité biologique majeure du TNF est de provoquer la lyse de cellules tumorales par nécrose ou apoptose (Tracey & Cerami, 1993; Barbara *et al.*, 1996; Tracey *et al.*, 2008).

- **L'interleukine 6**

C'est une cytokine de 185 AA (21,5 à 28 kDa). Bien qu'elle soit sécrétée par différents types cellulaires, l'IL-6 est majoritairement sécrétée par les monocytes, les fibroblastes et les cellules épithéliales stimulées ; après stimulation, les macrophages, les lymphocytes B et les lymphocytes T sont capables de sécréter l'IL-6. Tout comme l'IL-1, elle est impliquée dans la phase aiguë de l'inflammation en induisant la production de protéines par les hépatocytes.

Les protéines de la phase aiguë de l'inflammation sont constituées d'une trentaine de protéines aux diverses fonctions : des protéines inhibitrices de protéases (alpha-1 antitrypsin), des protéines modulatrices de la coagulation (antithrombine-3), des protéines composante du

complément (C2, C4, C9, Facteur B) et des protéines activatrices des macrophages (LPS Binding Protein (LBP)) (Ruminy *et al.*, 2001). Il existe deux types de protéines de la phase aiguë :

- ✚ le type I, qui pour être synthétisé en quantité, nécessite l'action synergique de l'IL-1 et de l'IL-6.

- ✚ le type II, qui pour une induction maximale ne nécessite que l'action de l'IL-6.

L'IL-6 est le médiateur le plus important lors de la phase aiguë de l'inflammation de part son nombre de fonction (fièvre notamment). Cette cytokine intervient dans la réponse immunitaire innée et est sécrétée par les macrophages en réponse à un PAMP. Cette cytokine possède également un rôle régulateur dans la mesure où elle induit la différenciation des lymphocytes B et l'activation/différenciation des lymphocytes T en cellules cytotoxiques (Gruys *et al.*, 2005).

- **Autres cytokines**

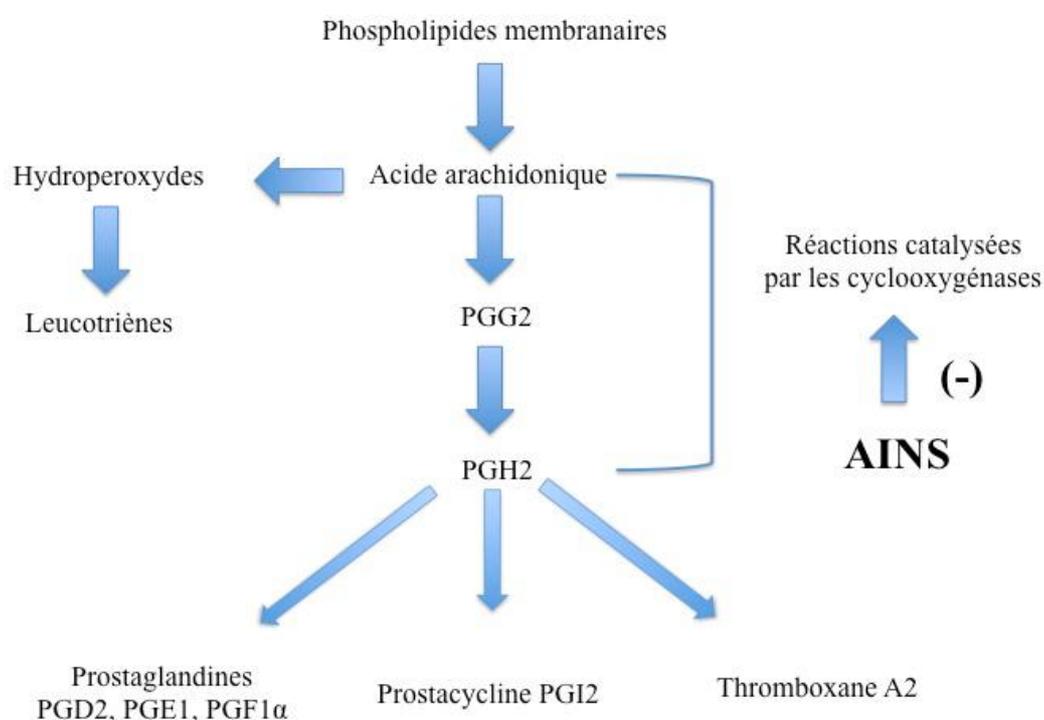
Il existe un très grand nombre de cytokines intervenant dans la régulation des processus inflammatoires. Dans la mesure où la plupart des cytokines exercent des activités variées selon le type cellulaire considéré, seuls les effets biologiques particuliers intervenant dans la réponse inflammatoire sont mentionnés.

#### 4. Anti-inflammatoires

##### 4.1. Anti-inflammatoire non stéroïdiens

Les anti-inflammatoire non stéroïdiens (AINS) sont une des classes thérapeutiques les plus utilisées dans le monde en raison de leurs propriétés anti-inflammatoires, anti-pyrétique et antalgiques. Actuellement, il y a plus de 50 différents AINS sur le marché mondial. Le mécanisme d'action des AINS a été précisé par les travaux de Vane en 1971, il repose en grande partie sur l'inhibition compétitive, réversible ou non, de la cyclooxygénase, enzyme qui permet la production de prostaglandine à partir de l'acide arachidonique. Cette caractéristique commune à tous les AINS conduit à une diminution de la production des prostaglandines (notamment la PGE2 et la PGI2), importants médiateurs de l'inflammation (figure 07). Même si d'autres modes d'action existent, cette activité explique largement les propriétés pharmacologiques et thérapeutiques des AINS, mais aussi une partie de leurs effets secondaires en raison du rôle ubiquitaire et des fonctions physiologiques des prostaglandines

(Nicolas *et al.*, 2001). Ainsi, la production exagérée de prostaglandines en situation pathologique participe à l'inflammation (vasodilatation, augmentation de la perméabilité capillaire) et à la douleur (sensibilisation des nocicepteurs) alors que sa production basale permet l'homéostasie tissulaire (production de mucus, de bicarbonates et maintien du flux sanguin sous muqueux gastrique, maintien de l'hémodynamique rénale en cas d'hypoperfusion en particulier). L'inhibition de la synthèse des prostaglandines par les AINS semblait donc jusqu'à récemment, devoir obligatoirement s'accompagner d'effets favorables et délétères (Blain *et al.*, 2000).



**Figure 05:** Mécanisme d'action des AINS (Nicolas *et al.*, 2001).

#### 4.2. Anti-inflammatoires stéroïdiens

Les anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS) constituent une vaste famille de médicaments dérivés du cortisol, principal glucocorticoïde surrénalien. Les glucocorticoïdes sont des substances dérivées du cholestérol, dont la production est stimulée par l'ACTH libérée selon un cycle nyctéméral par le lobe antérieur de l'hypophyse. Dans les tissus cibles, les

glucocorticoïdes se fixent à leurs récepteurs des glucocorticoïdes (GR) du cytoplasme de la cellule. Après quoi, le complexe récepteur-ligand formé pénètre dans le noyau cellulaire où il se fixe à de nombreux éléments de réponse aux glucocorticoïdes dans la région du promoteur des gènes-cibles. Le récepteur, ainsi fixé à la molécule d'ADN interagit avec les facteurs de transcription basiques, provoquant une augmentation de l'expression génique de gènes-cibles spécifiques. Ce processus est appelé transactivation et conditionne la plupart des effets secondaires métaboliques et cardiovasculaires des glucocorticoïdes. Le mécanisme opposé est appelé transrépression. Le récepteur hormonal activé interagit avec des facteurs de transcription spécifiques et prévient la transcription des gènes-cibles. Les glucocorticoïdes sont capables d'empêcher la transcription de tous les gènes immuns, incluant celui codant IL-2 (Barnes, 1998).

Les glucocorticoïdes ordinaires ne font pas de différence entre la trans activation et la transrépression, et influencent à la fois les gènes immuns "voulus" et ceux "non voulus" régulant les fonctions métaboliques et cardiovasculaires. Actuellement, les efforts de recherche visent à découvrir des glucocorticoïdes agissant sélectivement qui seraient capables de ne réprimer que le système immunitaire (Hanzen, 2003).

#### **4.3. Anti-inflammatoires d'origine végétale**

Le nombre de composés phytochimiques, trouvé dans le règne végétal est très vaste, et leur spectre d'activité est tout aussi grand. Certains de ces composés phytochimiques ont des propriétés anti inflammatoire. Beaucoup sont présumés agir en bloquant les voies de la cyclooxygénase et la lipoxigénase ainsi que par d'autres mécanismes (Barnes, 1998).

### III. Le stress oxydant

#### 1. Définition

Lorsque l'un des systèmes protectifs de l'organisme contre la toxicité des radicaux libres (RL) montre un échec, l'action des radicaux libres devient incontrôlable, ce qui conduit à des dommages au niveau des molécules, des cellules, des organes et potentiellement à la mort de l'organisme (Durackova, 2008).

La conséquence des effets nocifs des RL et des métabolites réactifs est dite « stress oxydant » (figure 06). Ce terme est défini initialement comme étant « Un déséquilibre profond de la balance entre les prooxydants et les antioxydants en faveur des premiers » (Baskin *et al.*, 1994 ; Barouki, 2006 ; Jenkins *et al.*, 2007). Cette définition ne signale aucun effet délétère d'un tel changement sur la fonction des tissus et n'indique pas l'origine de ce déséquilibre s'il est dû à une augmentation de la production des oxydants ou à une diminution de la capacité réductrice des tissus (Kehrer, 1993 ; Barouki, 2006). D'autres chercheurs ont dit que le stress oxydant désigne un état caractérisé par une augmentation de la génération des ROS (reactive oxygen species) en ajoutant que ce terme est synonyme du dommage (Kehrer, 1993).

Selon les points de vue actuels, le stress oxydant peut être défini comme étant « un déséquilibre entre la production et l'élimination des métabolites réactifs de l'oxygène et du nitrogène en faveur de leur production conduisant à des dommages potentiels (Durackova, 2008) et à des dégâts cellulaires irréversibles (Pincemail *et al.*, 1999 ; Abuja *et al.*, 2001)».

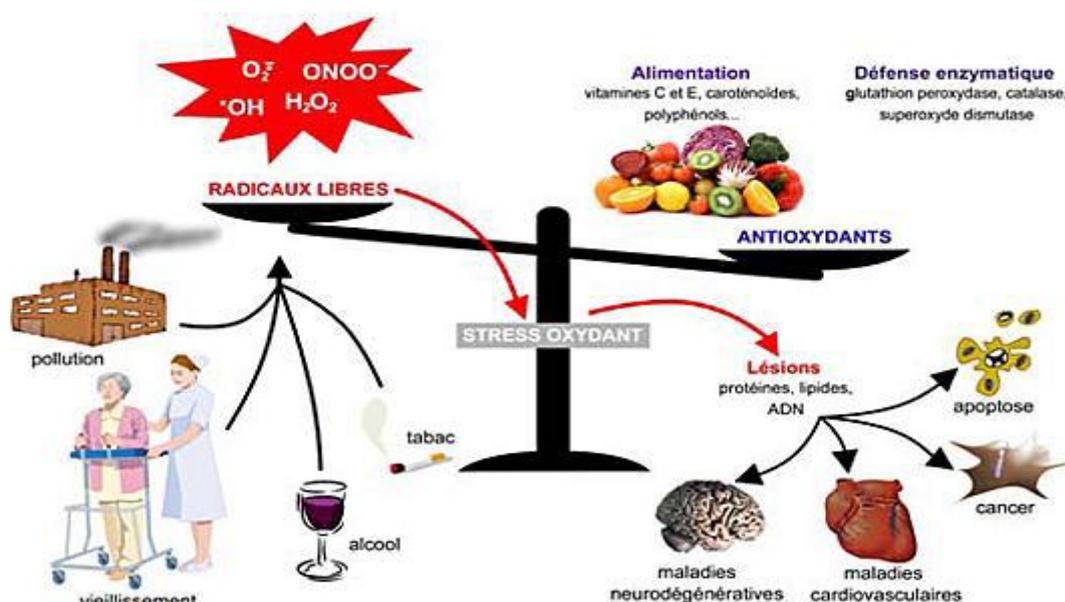
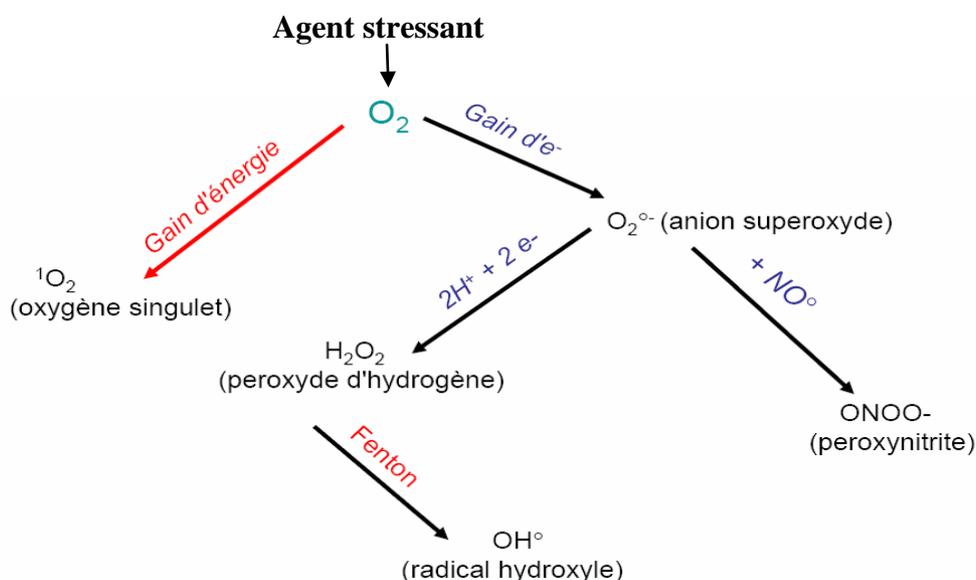


Figure 06 : Stress oxydant (Durackova, 2008)

## 2. Les espèces réactives de l'oxygène

L'oxygène représente, après l'azote, le deuxième élément le plus abondant dans l'atmosphère (21%). Il a été caractérisé en 1772-1774 par Lavoisier, un chimiste français. L'oxygène est un élément indispensable à la vie des organismes aérobies. Ces organismes utilisent l'oxygène pour oxyder les substrats riches en carbone et en hydrogène. Cependant, quand on oxyde les molécules avec l'oxygène, ce dernier est réduit et forme des intermédiaires radicalaires, très réactifs connus sous le nom espèces réactives de l'oxygène (ERO). Les ERO sont des molécules contenant de l'oxygène mais dont la réactivité est bien supérieure à celle de la molécule d'O<sub>2</sub>. Ces ERO comprennent des radicaux tels l'anion superoxyde (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) ou le radical hydroxyle (HO<sup>•</sup>) et les espèces non radicalaires telles le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), l'oxygène singulet (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) (Simonian and Coyle, 1996 ; Garrel *et al.*, 2007). L'anion superoxyde et le radical hydroxyle sont très instables par comparaison au H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> qui diffuse librement et possède une durée de vie plus longue. La réactivité d'un radical dépend de sa nature. Ainsi, parmi les radicaux formés chez les êtres vivants, l'anion radicalaire superoxyde (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) n'est pas très réactif mais constitue un des radicaux précurseurs pouvant être activés en d'autres espèces plus réactives. Sa faible réactivité (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) permet son utilisation par l'organisme comme médiateur régulant des fonctions biologiques. Par contre, les radicaux comme les peroxydes (ROO<sup>•</sup>) ou surtout le radical hydroxyle (HO<sup>•</sup>), sont extrêmement réactifs, et ce avec la plupart des molécules biologiques. Le peroxyde d'hydrogène est un oxydant faible et peu réactif en absence des métaux de transition. Cependant, en présence du cuivre cuivreux ou du fer ferreux, le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> peut se décomposer en HO<sup>•</sup> et HO<sup>•</sup> selon la réaction de Fenton. Le radical HO<sup>•</sup> a une vitesse de réaction très grande avec la majorité des molécules, si bien qu'il réagit à l'endroit même où le métal catalyse sa formation (figure 07) (Favier, 1997).



**Figure 07 :** Schéma modifié de l'origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqué en biologie (Favier, 2003)

L'oxygène singulet ( ${}^1O_2$ ) est une autre espèce oxygénée très réactive. C'est une molécule à l'état excité qui peut réagir avec différents accepteurs d'électrons pour produire des peroxydes. L'oxygène singulet n'apparaît que dans des cas particuliers comme pendant les processus de photosensibilisation où une molécule excitée transfère son énergie à l'oxygène et l'active en oxygène singulet. Il a pour cible biologique les membranes, les acides nucléiques et les protéines (Favier, 2003).

### 3. Les cibles biologiques du stress oxydant

L'équilibre entre les effets positifs et négatifs des radicaux libres est particulièrement fragile (Pincemail, 2003). La production de ces radicaux peut être régulée par notre organisme (Sies, 1991). Les systèmes de régulation se composent d'enzymes, de protéines, de molécules antioxydantes de petite taille et d'oligoéléments indispensables pour l'activité des enzymes. Un déséquilibre de la balance antioxydante en faveur de la production des ERO constitue le stress oxydant. Le stress oxydant va dénaturer les lipides, les protéines, l'ADN et provoquer des pathologies (Gutteridge, 1992 ; Curtin *et al.*, 2002).

### 3.1. Les lipides

Les premières cibles privilégiées de l'attaque radicalaire sont les lipides et principalement leurs acides gras polyinsaturés, qui sont très sensibles à l'oxydation en raison de leur degré élevé d'insaturation.

La peroxydation lipidique débute par une phase d'initiation qui implique l'attaque des espèces réactives surtout le radical hydroxyle ( $^{\circ}\text{OH}$ ), entraînant l'arrachement d'un hydrogène du l'acide gras (LH), ceci aboutit à la formation d'un radical diène conjugué, qui après addition avec l'oxygène moléculaire donne le radical peroxyde ( $\text{LOO}^{\circ}$ ). Ensuite, ce radical peut réagir avec un autre acide gras polyinsaturé et former un hydroperoxyde ( $\text{LOOH}$ ), c'est la phase « Propagation » de la peroxydation lipidique. Ces hydroperoxydes appartiennent à la famille des peroxydes lipidiques qui peuvent soit être réduits et neutralisés « phase de Terminaison » par la glutathion peroxydase et la vitamine E intercalée dans la bicouche lipidiques des membranes (Esterbauer *et al.*, 1992 ; Beaudeau *et al.*, 2003 ; Favier, 2003) (figure 08). Ou, continuer à s'oxyder et à se fragmenter en produits secondaires c'est-à-dire en aldéhydes très réactifs, pouvant être considérés comme des messagers secondaires toxiques qui augmentent les dommages initiaux dus aux radicaux libres. Parmi ces aldéhydes formés lors de la peroxydation lipidique, l'isoprostane, le malondialdéhyde (MDA), et le 4-hydroxynonéal (4-HNE), qui sont très étudiés comme marqueurs de la peroxydation lipidique, ces deux derniers produits (MDA, 4-HNE) réagissent avec les protéines et l'ADN, une fois fixé à la molécule d'ADN, le MDA semble être le produit le plus mutagène, alors que le 4-HNE est le plus toxique pour la cellule (Marnett, 1999).

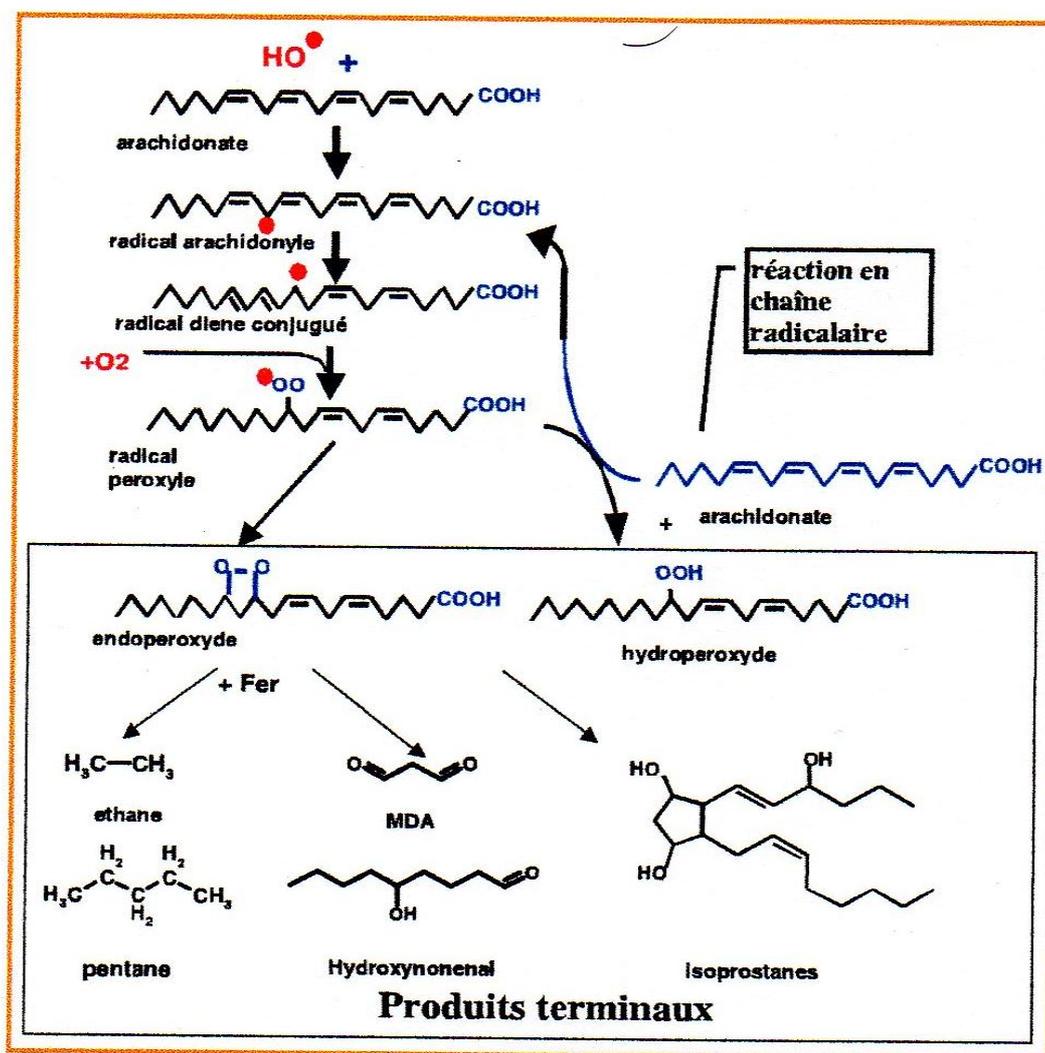
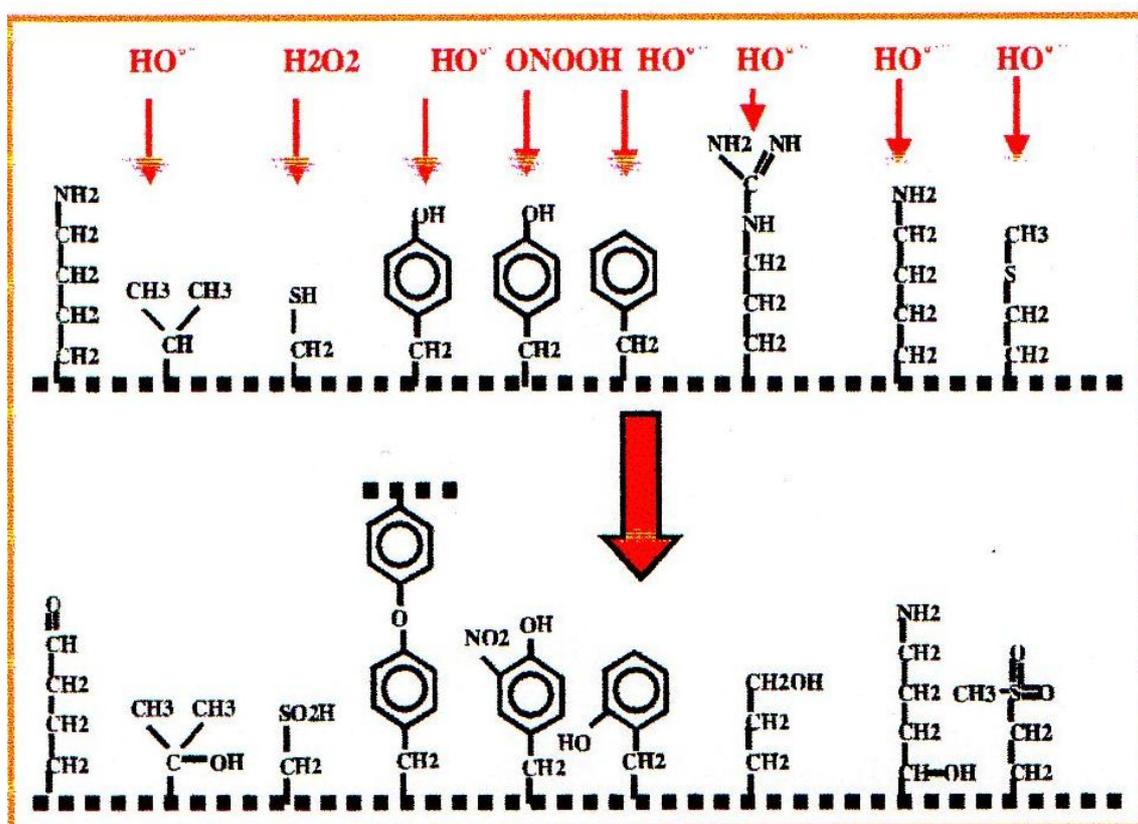


Figure08 : Réactions de la peroxydation lipidique (Favier, 2003).

### 3.2. Les protéines

Tout comme les lipides, les protéines peuvent également être la cible des réactions radicalaires ou oxydatives et subir des modifications, ces modifications provoquent l'introduction d'un groupe carbonyle dans les protéines. Ces réactions d'oxydations, fréquemment influencées par les cations métalliques comme le  $\text{Cu}^{2+}$  et le  $\text{Fe}^{2+}$  (Levine, 2002). Nous pouvons classer les réactions d'oxydations des protéines en deux catégories : D'une part, celles qui cassent les liaisons peptidiques et modifient la chaîne protéique. Et d'autre part, les modifications des peptides par l'addition des produits issus de la peroxydation lipidiques comme le 4-HNE. Ces changements sont elles qui conduisent généralement à une perte de la fonction catalytique, ou structurale des protéines affectées (Levine, 2002) (figure 09). Les protéines comportant un pont sulfhydrique sont les plus sensibles aux attaques

radicalaires, c'est le cas de nombreuses enzymes antioxydantes et les protéines de transport, qui contiennent très souvent des groupements thiols (SH) (Sen, 2001). Les protéines modifiées par l'oxydation, vont être prises en charge par des protéines spécifiques dites protéines de stress (Heat Shock Protein, HSP) connues pour leur rôle cytoprotecteur, où elles prennent en charge les protéines dénaturées et participent à la restauration de la fonction de ces protéines (Welch, 1992). Les HSP permettent à la cellule de répondre à des stress de façon rapide, et la synthèse des HSP pourrait ainsi compléter les capacités de défenses antioxydantes lorsque les protéines intracellulaires sont endommagées par les ROS (Essig and Nosek, 1997).



**Figure 09 :** Nature de quelques modifications des chaînes latérales, d'acides aminés des Protéines après attaque radicalaire (Favier, 2003).

### 3.3. Les acide nucléiques

L'ADN nucléaire et ADN mitochondrial. Ce dernier est la cible privilégiée des oxydations par les ROS, du fait sa proximité directe de l'une des principales sources de ROS cellulaires : la chaîne respiratoire mitochondriale (Stevnsner, 2002).

Les réactions d'oxydation de l'ADN créant un grand nombre de dommages de l'ADN, et on peut noter quatre classes principales des dommages : les coupures simples et doubles brins, les bases modifiées comme la 8-OHdG (qui est un marqueur des dommages oxydatifs de l'ADN), les pontages ADN-ADN et les pontages ADN-protéines (figure 10) (Hayakawa *et al.*, 1991). Les bases puriques sont plus sensibles aux ROS (surtout l' $^{\circ}\text{OH}$  et le peroxydant), en particulier la guanine (base qui présente le potentiel d'oxydation le plus bas), qui est facilement transformée en 8-hydroxy-2-déoxyguanosine (8-OHdG) qui est normalement éliminée par des enzymes de réparation de l'ADN. Si ces systèmes sont défaillants, La 8-OHdG s'accumulera au sein de l'ADN (Cadet, 1999). Les aldéhydes réactifs issus de la peroxydation lipidique dont le MDA et le 4-HNE peuvent s'ajouter au groupe amine des bases de l'ADN et constituer ainsi une autre classe de dégâts oxydatifs de l'ADN (Marnett, 1999 ; Nair *et al.*, 1999).

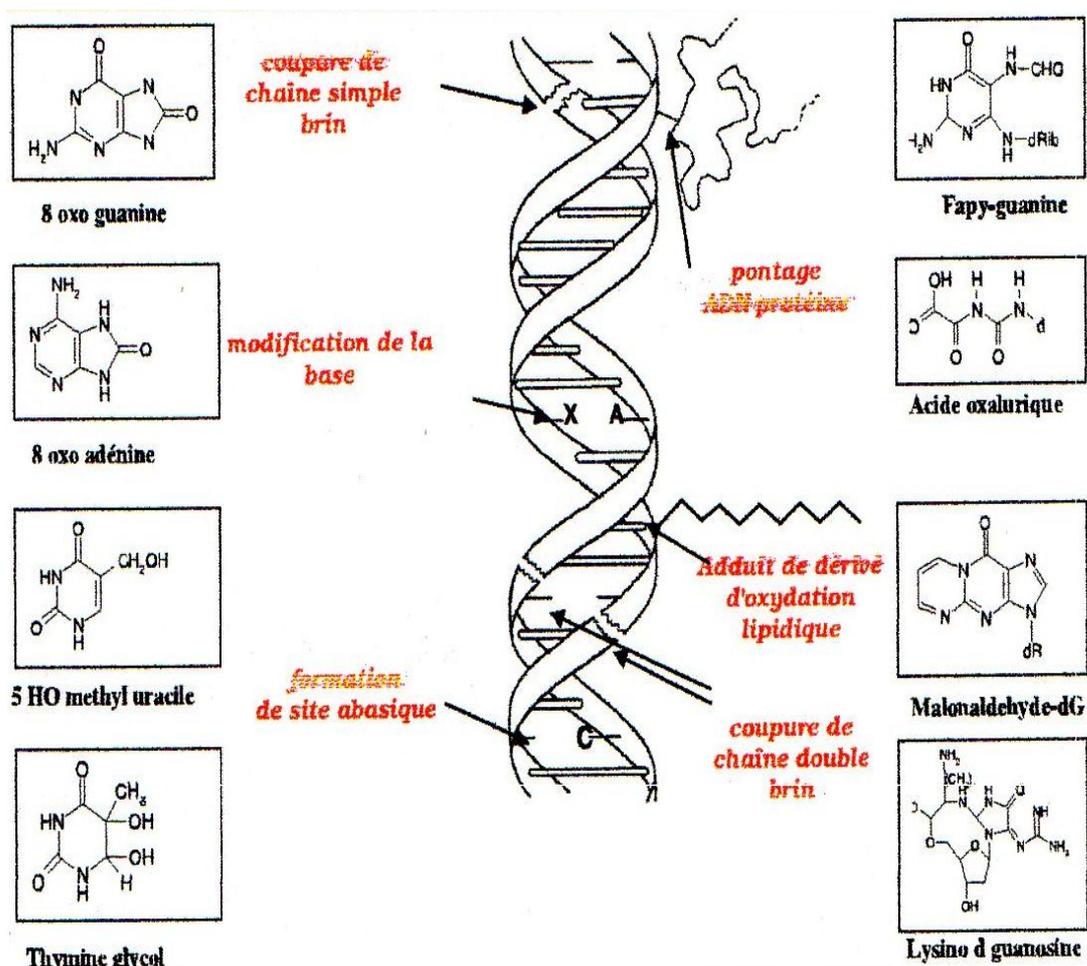


Figure 10 : Types de lésions de l'ADN provoqués par les attaques radicalaires (Favier, 2003)

#### 4. Le stress oxydant et les pathologies

Le stress oxydant est potentiellement impliqué dans de nombreuses maladies comme facteur déclenchant, ou associé à des complications lors de leur évolution. Ces pathologies peuvent découler d'intoxications chimiques et médicamenteuses, d'exposition à des rayonnements, d'un syndrome d'hyperoxygénation, de phénomènes inflammatoires. La multiplicité des conséquences médicales de ce stress oxydant vient du fait que de nombreux organes ou tissus peuvent devenir la cible d'un stress oxydant (Bonnefont- Rousselot *et al.*, 2001 ; Sohal *et al.*, 2002 ; Delattre *et al.*, 2005).

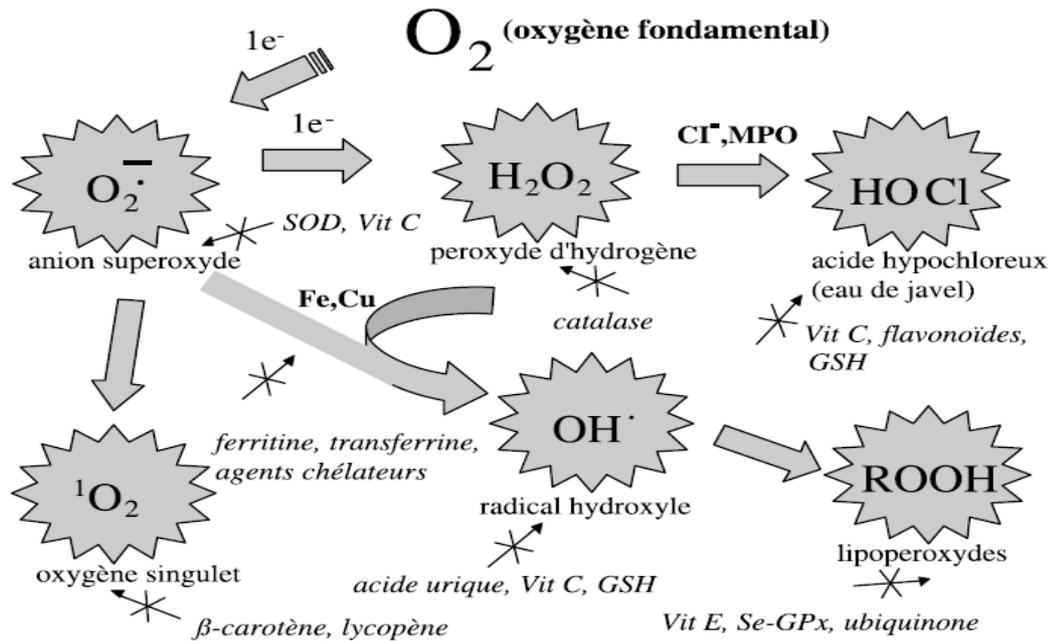
Le stress oxydant est impliqué dans le développement des maladies comme : le cancer, les maladies neurodégénératives et le vieillissement accéléré. Il est admis que le stress oxydant est un facteur potentialisant l'apparition de maladies multifactorielles comme les maladies cardiovasculaires, le diabète, et la maladie d'Alzheimer (Montagnier *et al.*, 1998).

Si le stress oxydant est réellement un facteur déclenchant ou participant au déclenchement de ces pathologies, il est logique de penser que la prise d'antioxydant peut retarder, prévenir l'apparition de telles maladies. De même, des études (Holzenberger *et al.*, 2003 ; Delattre *et al.*, 2005) ont montré que le vieillissement s'accompagne d'une diminution des défenses antioxydantes, d'une augmentation de la production des ROS, et d'une diminution des systèmes de réparation et de dégradation des constituants oxydés. Une étude épidémiologique (Bonnefont-Rousselot, 2001) a montré très clairement que la consommation régulière des antioxydants permet de diminuer l'incidence de l'apparition d'un stress oxydant et ces maladies.

#### 5. Systèmes de défenses antioxydants

Le maintien d'un niveau non cytotoxique des EOR est assuré par des systèmes d'antioxydants. Un antioxydant peut être défini comme toute substance capable, à concentration relativement faible, d'entrer en compétition avec d'autres substrats oxydables et ainsi retarder ou empêcher l'oxydation de ces substrats. Les cellules utilisent de nombreuses stratégies anti-oxydantes et consomment beaucoup d'énergie pour contrôler leurs niveaux d'espèces réactives de l'oxygène (figure 11). La nature des systèmes antioxydants diffère selon les tissus et les types cellulaires et selon qu'on se trouve dans le milieu intracellulaire ou

extracellulaire. Les défenses antioxydantes de notre organisme peuvent se diviser en systèmes enzymatiques et systèmes non enzymatiques (Goudable et Favier, 1997).



**Figure 11** : Régulation de la production d'espèces réactives de l'oxygène par les systèmes de défenses antioxydantes (Milbury et Richer *et al.*, 2008).

### 5.1. Les systèmes enzymatiques

Il s'agit principalement de trois enzymes, (I) la superoxyde dismutase (SOD), (II) la catalase (CAT) et (III) la glutathion peroxydase (GPx). Ces enzymes ont une action complémentaire sur la cascade radicalaire au niveau du  $O_2^{\bullet -}$  et du  $H_2O_2$ , conduisant finalement à la formation de l'eau et de l'oxygène moléculaire (Lehucher-Michel *et al.*, 2001).

#### a) La Superoxyde dismutase

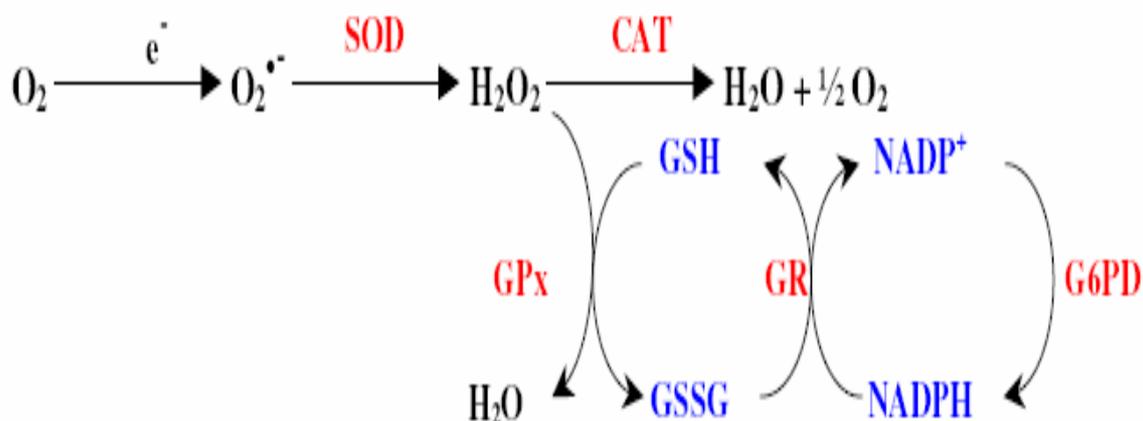
Comme l'indique son nom, la superoxyde dismutase (SOD) accélère la dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène. Il existe plusieurs isoenzymes de SOD ; SOD ferreux (Fe-SOD), SOD à cuivre (Cu-SOD) et SOD à manganèse (Mn-SOD) qui diffèrent selon la localisation chromosomique du gène, leur contenu métallique, leur structure quaternaire et leur localisation cellulaire (Zelko *et al.*, 2002).

### b) La catalase

Présente en particulier dans les hématies et les peroxysomes hépatiques. Elle agit en synergie avec la SOD puisque son rôle est d'accélérer la dismutation du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire (Sorg, 2004).

### c) Les glutathions peroxydases et réductases

Ces deux enzymes sont localisées dans le cytosol et dans les mitochondries. La glutathion peroxydase est une sélénoenzyme (Se-GPx) qui joue un rôle très important dans la détoxification du peroxyde d'hydrogène, mais aussi d'autres hydroperoxydes résultants de l'oxydation du cholestérol ou des acides gras en couplant la réduction de ces dérivés réactifs avec l'oxydation de substrats réducteurs comme le glutathion (GSH). La glutathion réductase (GR), quant à elle, a pour rôle de régénérer le GSH à partir du GSSG tout en utilisant le NADPH comme un cofacteur (Martínez-Cayuela, 1995 ; Sorg, 2004). Au total, le mécanisme réactionnel invoqué dans cette détoxification enzymatique peut être résumé dans le schéma suivant :



**Figure 12 :** Schéma résume le mécanisme de détoxification enzymatique (Piquet et herbuterne, 2007).

## 5.2. Les systèmes antioxydants non enzymatiques

Contrairement aux enzymes antioxydantes, la plupart de ces composants ne sont pas synthétisés par l'organisme et doivent être apportés par l'alimentation. Dans cette catégorie d'antioxydant nous retrouvons les oligoéléments, la glutathion réduit (GSH), l'ubiquinone, le Cytochrome C et les vitamines E et C (Favier, 2003).

### 5.2.1. Le Glutathion réduit (GSH)

Le glutathion réduit (GSH), réduit le peroxyde d'hydrogène et/ou les peroxydes organiques grâce à la réaction catalysée par la glutathion peroxydase (GSH-Px). Il peut aussi réduire les radicaux formés par l'oxydation des vitamines E et C, baissant ainsi les niveaux de peroxydation lipidique (Packer *et al.*, 1997 ;Power and Lennon, 1999). Le rapport glutathion réduit/glutathion oxydé (GSH/GSSG) est souvent utilisé comme un marqueur du stress oxydant car plus le flux d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est important, plus le glutathion réduit est consommé et le glutathion oxydé augmenté (Ji *et al.*, 1992).

### 5.2.2. La Vitamine E

La vitamine E est le nom commun utilisé pour toutes les molécules possédant des activités biologiques identiques à celles de la famille des tocophérols. La forme naturelle de la vitamine E inclut quatre tocophérols isomères  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ , avec une activité antioxydante variable. L' $\alpha$ -tocophérol est la forme la plus active de la classe des tocophérols. Sa structure moléculaire comporte une extrémité hydrophile et une extrémité hydrophobe. Lors de l'initiation de la peroxydation lipidique, suite à une attaque radicalaire, l' $\alpha$ -tocophérol, connu comme inhibiteur de la propagation de la peroxydation lipidique, cède son hydrogène situé dans le noyau phénolique, réduisant ainsi le radical RO<sub>2</sub> (Singh *et al.*, 2005).

### 5.2.3. La Vitamine C

La vitamine C (acide ascorbique) n'est pas synthétisée par l'organisme. Elle est hydrosoluble à la concentration physiologique. La vitamine C empêche l'oxydation des LDL produites par divers systèmes générateurs d'espèces réactives de l'oxygène (neutrophiles activés, cellules endothéliales activées, myéloperoxydase). Lors de son oxydation en acide déhydroascorbique, elle prend une forme radicalaire intermédiaire (radical ascorbyl) qui joue un rôle essentiel dans la régénération de la vitamine E oxydée (Singh *et al.*, 2005)

### 5.2.4. Les métallothionéines (MTs)

Les métallothionéines sont des protéines intracellulaires de faible poids moléculaire (6000-7000 Da) (Kagi, 1993). Ils possèdent une composition spéciale d'acides aminés. En effet, elles ne possèdent pas d'acides aminés aromatiques dont le tiers des résidus sont des cystéines servant comme ligand aux métaux. La synthèse des MTs est induite par des facteurs divers, tels que les métaux, les glucocorticoïdes et les radiations ionisantes (Cherian, 1995). Les MTs sont supposées jouer des rôles physiologiques multiples, incluant la détoxification des

métaux potentiellement toxiques (Pb, Cd, Ni...), la régulation des métaux essentiels à l'état de trace, tels que le zinc, le cuivre et le chrome et la participation dans les systèmes cellulaires de défense antioxydante (Diana, 1999). A cause de leur teneur élevée en groupements sulfhydriques, les MT peuvent réagir avec les radicaux libres ERO et les électrophiles (Lazo et pitt, 1995).

### **5.2.5. Le Sélénium**

Le sélénium est un antioxydant. Ce terme caractérise un ensemble de substances ou de composés, de nature diverse, dont la caractéristique commune est d'être capable de s'opposer ou de contrôler l'accumulation au niveau cellulaire de radicaux libres. Cette propriété leur permet d'agir en tant que moyen de défense contre les dérivés actifs de l'oxygène. Ils s'opposent aux mécanismes d'oxydation de certaines molécules. Certains micronutriments, comme les vitamines (E, C, bêta- carotène) et oligo- éléments (zinc, sélénium) ont une activité antioxydante et sont donc susceptibles d'intervenir dans les mécanismes de protection contre la production de métabolites de l'oxygène actif. Le sélénium intervient dans l'activité du système enzymatique protecteur, le glutathion peroxydase qui accélère la transformation des radicaux libres et des peroxydes lipidiques en métabolites non- toxiques (Galan et al., 1997)

#### **5.2.5.1. Les Principales formes chimiques du sélénium**

Le sélénium est présent dans la nature et les organismes animaux et végétaux sous des formes organiques et inorganiques. Les formes organiques sont la sélénométhionine et la sélélocystéine ; les formes inorganiques sont les sélénite, séléniure, sélénite et l'élément sélénium .alors que la forme dominante dans la nourriture quotidienne et les fourage est la sélénométhionine, associée à des quantités plus négligeables de sélélocystéine et sélénite, les formes usuelles de complémentation orale sont le sélénite de sodium, le sélénite de sodium, le sélénite de potassium et le sélénite de baryum (Graham, 1991).

#### **5.2.5.2. Les sources alimentaires du sélénium**

Le sélénium est essentiellement apporté par les poissons (30 à 40 µg pour 100g), les coquillages et les crustacés (30 à 50 µg pour 100g). les viandes (5 à 20 µg pour 100g). Les œufs (20 µg pour 100g) sont également une excellente source de sélénium. En revanche, les fruits et les légumes des sources très pauvres (Whitin *et al.*, 2002).

### 5.2.5.3. Le métabolisme du sélénium

Le sélénium est un micronutriment essentiel pour la majorité des espèces animales y compris l'homme. Il est nécessaire à de nombreuses enzymes en particulier l'hème oxydase et la glutathion peroxydase, impliquées dans la défense cellulaire contre le stress oxydatif (Lanchli, 1993).

- **L'absorption du sélénium**

L'absorption du sélénium se fait principalement dans le duodénum chez les ruminants par un transport actif, grâce à une pompe à sodium. Différents éléments peuvent influencer son absorption : le soufre, le plomb et l'arsenic diminuent le taux d'absorption du sélénium ; il en est de même pour le  $\text{Fe}^{3+}$  qui précipite avec le Se pour former un complexe non assimilable par les entérocytes. Les formes inorganiques comme le sélénite de sodium et le sélénate de sodium sont absorbés respectivement à 62% et 94% chez les monogastriques. Toutefois, les sélénates ont une excrétion urinaire 6 fois plus élevée et qui se produit 3h plus tôt que celle des sélénites (Thomson et Robinson, 1986). Les formes organiques telles que la sélénométhionine et la sélélocystéine sont respectivement absorbées à 81% et 86% et excrétées à 13,9% et 5,8% chez le rat (Lebreton et al., 1998). Chez l'homme, la sélénométhionine est mieux absorbée que les composés 34 minéraux (80% contre 50%) et elle entraîne une augmentation du taux de Se sanguin supérieure à celle observée avec des quantités équivalentes de sélénite (Dubois et Belleville, 1988).

- **Le Transport du sélénium**

Les formes solubles du sélénium sont redistribuées dans tout l'organisme à partir du duodénum (Graham, 1991). Chez le rat, une protéine plasmatique contenant de la sélélocystéine a été identifiée comme étant une protéine « transport » de sélénium : la séléloprotéine P. Sa concentration varie directement avec la concentration alimentaire en sélénium lorsque celle-ci est supérieure à 0,1 mg/kg d'aliment. D'après Underwood et Suttle (2004) suggère que cette protéine joue un rôle antioxydant.

Les formes organiques traverseraient mieux les membranes érythrocytaires que les formes ioniques. Le sélénium se lie aux globulines, albumines et autres protéines non spécifiques (Lebreton et al., 1998). Les mécanismes de transfert du sélénium à l'intérieur des cellules sont

encore peu expliqués. D'après Graham (1991), le transfert placentaire du sélénium est corrélé positivement au statut sélénié de la mère. La concentration hépatique est plus élevée chez le fœtus que chez la mère tout au long de la gestation ( Hidiroglou *et al.* (1994).

- **La Distribution du sélénium**

Le sélénium est ensuite distribué dans les tissus cibles (rein, foie, muscles, os, rate, pancréas, Poumons) selon des mécanismes encore inconnus.

- **L'élimination du sélénium**

La voie urinaire est la voie d'excrétion majoritaire. D'après Lebreton *et al.* (1998), elle représente 60% de l'excrétion lors d'apport satisfaisant en sélénium. La sécrétion biliaire en sélénium peut atteindre 28% des apports. Bien que la majorité soit réabsorbée, le reste contribue significativement aux pertes fécales endogènes. D'après Lebreton *et al.* (1998), 35% environ de l'excrétion a lieu via la bile. La plus grande partie en est réabsorbée. Par ailleurs, le sélénium injecté par voie parentérale s'accumulerait principalement dans le foie et serait excrété de manière importante par la bile. Ainsi la quantité de sélénium excrétée par voie fécale est corrélée à la quantité de sélénium ingérée ( Underwood et Suttle, 2004).

#### **5.2.5.4. Les formes actives du sélénium**

Le sélénium n'est pas actif en tant qu'élément simple mais au sein du site actif de certaines enzymes. Il y est toujours incorporé à partir de la sélénocystéine, via un transfert spécifique d'ARN dont le mécanisme n'a pas encore été étudié. L'enzyme la plus connue, que nous étudierons en premier lieu, est la glutathion peroxydase, découverte en 1957 par Gordon C.Mills (Vichtel, 1998).

- **La glutathion peroxydase**

Quatre sont répertoriées : la glutathion peroxydase cellulaire (GPX1), la glutathion peroxydase plasmatique (GPX2), la glutathion peroxydase capable de neutraliser les hydroperoxydes phospholipidiques (GPX3) et la glutathion peroxydase présente au niveau gastro-intestinal (GPX4). Une cinquième a récemment été découverte. Chaque glutathion

peroxydase utilise le glutathion comme substrat au cours des réactions dans lesquelles elles interviennent, d'où leur nom. Leur rôle est de catalyser la transformation du peroxyde d'hydrogène en eau et en molécules inertes ou de réduire des hydroperoxydes phospholipidiques membranaires. Le tableau suivant représente les différentes sélénocoenzymes, leur localisation et leur rôle (Underwood et Suttle, 2004).

**Tableau 01 :** Récapitule les différentes sélénocoenzymes, leur localisation et leur rôle, s'ils sont connus (Underwood et Suttle, 2004)

Nomenclature	Sélénoprotéine	Principales localisations	Fonction
<b>GPX1</b>	GSH peroxydase cytosolique (GPX)	Cytosol, érythrocytes	Stockage, antioxydant
<b>GPX2</b>	GPX plasmatique	Plasma, reins, poumons	Antioxydant extracellulaire
<b>GPX3</b>	GPX phospholipidique	Membranes intracellulaires	Antioxydant intracellulaire
<b>GPX4</b>	GPX gastrointestinal	Muqueuses intestinal	Antioxydant des muqueuses

#### 5.2.5.5. Le rôle biologique du sélénium

La glutathion peroxydase est une métallo-enzyme de 84000 Daltons, constituée de 4 sous unités identiques de 21000 Daltons. Chaque sous-unité possède un atome de sélénium sous forme de sélénocystéine. Cette dernière est un analogue de la cystéine dans laquelle l'atome de soufre a été remplacé par un atome de sélénium.

La GPx, localisée dans les mitochondries et le cytoplasme, catalyse la réduction du peroxyde d'hydrogène et d'autres hydroperoxydes lipidiques :



La glutathion peroxydase constitue le système enzymatique anti-oxydant principal, elle protège ainsi les cellules des mammifères contre le stress oxydatif.

Le sélénium joue un rôle fondamental en tant que cofacteur biologique de la glutathion peroxydase dans la lutte contre les radicaux libres. Le glutathion est capable de piéger et de neutraliser la plupart des radicaux libres et leurs effets toxiques. Chez l'homme, le se sous forme de sélénocysteine constitue le site actif de la glutathion peroxydase cette enzyme localisée a la fois dans le cytosol et les radicaux libres en présence de glutathion réduit (Wichtel, 1998).

- **Le Rôle du sélénium dans la réponse immunitaire**

Le sélénium se conduit comme un modulateur de la production de médiateurs de l'inflammation. Lors de carences, la production de prostacycline antiagrégante et vasodilatatrice est 35diminuée au profit du thromboxane A2 proagrégant et vasoconstricteur. La complémentation en sélénium inverse cette tendance (Lebton et al, 1998).

Lors de carences en vitamine E et sélénium, une supplémentation en ces deux éléments (l'un et/ou l'autre) induit une potentialisation de la réponse en anticorps. D'autre part, le sélénium intervient sur l'immunité en stimulant la migration des cellules phagocytaires, la phagocytose et la réactivité des lymphocytes (Finch et al, 1996).

- **Autres rôles du sélénium**

Le sélénium est capable de former des complexes avec certains métaux comme l'argent, le mercure, le cadmium etc. ces complexes jouent un rôle dans la détoxification de ces métaux mais ils rendent le sélénium moins disponible.

Le sélénium est également un oligoélément indispensable pour la croissance de certaines cellules in vitro (Dubois et Belleville, 1988).

#### **5.2.5.6. Le stress oxydant et le sélénium**

Le sélénium joue un rôle fondamental dans le système de protection cellulaire. En effet, le statut en sélénium est corrélé à la capacité antioxydante tissulaire (Brigelius-flohe et coll., 2003). Le sélénium est capable de moduler à la fois la teneur des enzymes antioxydantes telles que la glutathion peroxydase ou la thioredoxine réductase ainsi que leur activité respective. Par ce biais, il est impliqué dans les défenses cellulaires endogènes contre les divers hydroperoxydes produits dans certaines situation physiologiques ou physiopathologiques (Papp et coll, 2007).



## IV. L'huile d'argan

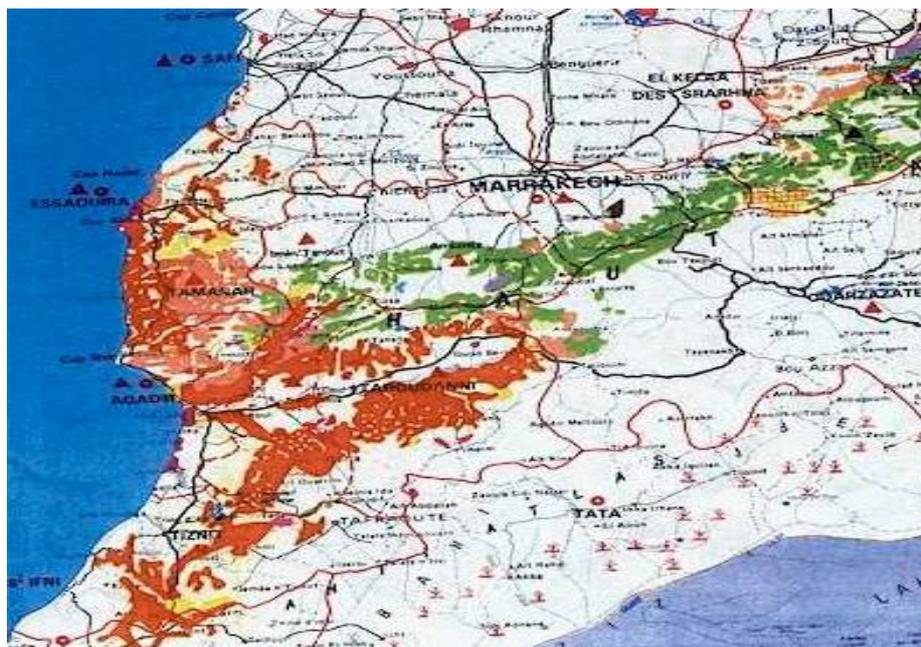
### 1. L'arganier

#### 1.1. Aspect historique

Les premières données sur l'arganier ont été citées par les géographes et les savants arabes qui étudièrent plus particulièrement la région du Maghreb, tels Al-Bekri (XI<sup>ème</sup> siècle) et Chérif Al-Idrissi (XII<sup>ème</sup> siècle). L'une des plus anciennes mentions de l'arganier et du mode d'obtention artisanal de l'huile est celle du médecin andalous Dya Aldin Ibn Al Baytar (XII<sup>ème</sup> siècle) dans son ouvrage « Traité des simples » (Gonzalez, 1997 ; Adlouni, 2010).

#### 1.2. Répartition géographique

L'arganier est une espèce endémique du sud-ouest Marocain où il couvre une superficie de plus de 830000 ha (à peu près 21 millions d'arbres, de même des colonies isolées d'arganier se trouvent également au nord-est du Maroc du côté d'Oujda, dans les monts des Béni-Snassen, et dans le sud-ouest de l'Algérie, dans la région de Oued Elma près de la wilaya de Tindouf (figure 13) (khallouki *et al.*, 2005).



**Figure13** : L'arganier dans l'Atlas (Benarbi et Fennane, 1994).

Les zones rouges : zones à fort peuplement en arganiers

### 1.3. La classification botanique

L'arganier appartient à la famille des Sapotacées, du genre *Argania* et d'espèce *spinosa*. Sa classification botanique selon Quezel et santa (1962) se présente comme suit :

<b>Nom :</b>	<i>Argania spinosa L. (skeels)</i>
<b>Embranchement :</b>	<i>Phanérogammes</i>
<b>Sous-embranchement :</b>	<i>Angiospermes</i>
<b>Classe :</b>	<i>Dicotylédones</i>
<b>Sous-classe :</b>	<i>Gamopétales</i>
<b>Ordre :</b>	<i>Ebenales</i>
<b>Famille :</b>	<i>Sapotacées</i>
<b>Genre :</b>	<i>Argania</i>
<b>Espèce :</b>	<i>Spinosa</i>

### 1.4. La Botanique de l'arganier

#### 1.4.1. Son aspect général

L'arganier est un arbre épineux, C'est un arbre relique de l'ère tertiaire et il est le seul représentant de la famille des sapotacées à se développer en dehors de la zone intertropicale. Parfaitement adapté à l'aridité du sud-ouest marocain, il supporte des températures allant de 3° à 50° C. L'arganier présente sous forme de buissons ou dressé (7 à 10m). Sa croissance est lente mais l'arganier est un arbre très résistant qui peut vivre de 150 à 200 ans. Sa silhouette est caractéristique : cime large et ronde, tronc noueux, tortueux et assez court, souvent formé de plusieurs parties entrelacées (figure 14).



**Figure 14 :** L'arganier (Radi, 2003).

#### 1.4.2. Son fruit

Le fruit de l'arganier (figure 15), dont l'étude morphologique a fait l'objet de nombreux travaux. Les dimensions du fruit varient de 17 à 30 mm de long et de 10 à 17 mm de large. Sa couleur est verdâtre avant maturation, puis elle évolue vers le jaune ou jaune-brun clair suivant les arbres. La couleur sombre se développe après abscission. La pulpe du fruit de l'Arganier, appelée également péricarpe, est la partie la plus externe qui enveloppe la graine. Cette pulpe est charnue, amère mais très riche en glucides solubles ou facilement hydrosolubles. Elle contient également de la cellulose et constitue un apport très important dans l'alimentation du bétail (Collier & Lemaire 1974). Suivant le degré de maturation du fruit, la pulpe change de couleur. Elle passe du vert au jaune veiné de rouge à la maturation puis au brun foncé une fois desséchée. Le fruit de l'Arganier renferme une graine composée, appelée noyau. Ce dernier est très dur et renferme une ou plusieurs amandes.



**Figure 15 :** Photo du fruit de la graine et de l'amande de l'Arganier

### 1.4.3. Sa graine

Le fruit de l'arganier renferme une graine composée, appelée vulgairement noyau. Ce dernier est très dur et renferme une ou plusieurs amandes (figure 16).

L'amande elliptique, oléagineuse et aplatie représente au plus le vingtième du poids du fruit (Emberger, 1960). L'huile d'argane est extraite de l'amande, il en résulte une huile comestible et un tourteau. Cette huile représente 25 % de l'apport en corps gras dans la région où pousse l'arganier. Le rendement en huile dépend de la méthode d'extraction et peut varier entre 35 et 55 %.



**Figure 16 :** Le noyau de fruit de l'arganier

## 2. L'huile d'argan

L'huile d'argan représente économiquement le produit le plus rentable de l'arganier, elle est extraite à partir des fruits oléagineux. Cette huile représente un produit international relativement nouveau et elle est exportée uniquement par le Maroc. Cependant, les distributeurs en Europe et en Amérique du Nord redistribuent l'huile dans le monde entier sur les marchés étrangers en Amérique du Nord, en Europe et en Asie. La demande croissante pour l'huile d'Argan a eu pour conséquence une augmentation très importante de son prix sur le marché européen (100€/litre). Ce qui classerait cette huile dans la gamme d'aliment de luxe (Cherki *et al.*, 2006).

### 2.1. Extraction de l'huile d'argan

L'huile d'argan est extraite suivant plusieurs procédés à partir de l'amande du fruit (Figure 15), soit selon la méthode traditionnelle, ou par presse ou en utilisant des solvants d'extraction. L'utilisation de ces différentes huiles est destinée à la nutrition, la cosmétique ou la médecine (Charrouf et Guillaume, 1999). Récemment, il a été montré que l'origine géographique des fruits d'argan et la méthode d'extraction utilisée pour produire de l'huile, ont une influence considérable sur sa composition et ses caractéristiques physico-chimiques (Hilali *et al.*, 2005).

### 2.1.1. Extraction artisanale

Pendant des siècles, l'huile d'argan vierge a été préparée exclusivement par les femmes qui ont utilisé un processus traditionnel transmis de génération en génération. Ce procédé traditionnel comprend cinq étapes : dépulpage des fruits, concassage de la coque entre deux pierres, torréfaction de l'amande oléagineuse. broyage des amandes torréfiées à l'aide d'unemeule en pierre et pression manuelle de la pâte pour l'obtention de l'huile qui est séparée par décantation (Charrouf et Guillaume, 1999). À l'heure actuelle, cette méthode traditionnelle, est utilisée uniquement pour la consommation domestique locale. Cependant, l'adaptation récente d'une méthode d'extraction semi-industrialisée ou semi-automatique dans les coopératives a permis de commercialiser une huile d'argan vierge de qualité certifiée (Cabrera-Vique *et al.*, 2012).



**Figure 17:** 1) Dépulpage du fruit, 2) concassage des noix et 3) torréfaction traditionnelle des amandons



**Figure 18:** Trituration, malaxage et pressage manuel.

### 2.1.2. Extraction par la presse mécanique

Depuis quelques années, le processus de l'extraction par une presse mécanique a été introduit dans les coopératives produisant l'huile d'argan. Dans ce processus, le dépulpage des fruits est réalisé en utilisant des machines « dépulpeuse-gratteuse », la torréfaction est faite par des torréfacteurs à gaz et la pression de la pâte pour l'obtention de l'huile est réalisée par des machines de presse (Charrouf et Guillaume, 2008). Ce procédé permet à la fois de s'affranchir de l'étape de mélange (pâte/eau), de réduire considérablement le temps de production, d'atteindre un rendement supérieur à 45% (volume/poids d'amande) et de garantir

une reproductibilité d'extraction de l'huile d'Argan de qualité équivalente (Charrouf et Guillaume, 1999).

En effet, l'huile pressée à froid et l'huile vierge sont deux termes qui peuvent être source de confusion. Dans ce sens, des éclaircissements ont été récemment apportés à ce problème par Matthäus et Spenser (2008). Ces derniers ont démontré que le terme huile pressée à froid peut être utilisé lors d'extraction mécanique de la matière première sans application de chaleur. Toutefois, le traitement thermique est autorisé lors de la préparation de la matière première, ou/et lors de la préparation de l'huile après la pression de la pâte. Selon cette définition, l'huile d'Argan comestible est une huile pressée à froid des amandes torréfiés de l'arganier. Donc, l'huile pressée à froid est également une l'huile vierge, tandis qu'une huile vierge n'est pas nécessairement une huile pressée à froid (Matthäus et Spenser, 2008).



**Figure 19 :** Les machines utilisées pour l'extraction de l'huile d'argan

### **2.1.3. Extraction par les solvants organiques**

Pour l'industrie ou les applications au laboratoire l'huile d'argan est extraite avec un solvant volatil lipophile (ex : hexane). Après évaporation du solvant, l'huile est obtenue avec un rendement de 50-55%. Cette huile sera destinée exclusivement à l'usage cosmétologique car elle est dépourvue de goût et d'arôme et par conséquent elle ne serait pas appréciée par le consommateur (Charrouf et Guillaume, 1999).

## **2.2. La Phytochimie de l'huile d'argan**

### **2.2.1. Les Caractéristiques physico-chimiques**

La densité d'huile d'argan est de 0,906 à 0,919. Son indice de réfraction est de 1,463 à 1,472 et son indice d'acide compris entre 0,8 et 2,5. L'indice d'acide de l'huile d'argan extra vierge doit être inférieur à 0,8 selon le Service de normalisation industrielle Snima (Tableau 2).

**Tableau 2 :** Caractères physico-chimiques de l'huile d'argan

Constantes	Norme marocaine
Indice d'acide g%g	≤3.3
Indice de peroxyde meq/kg	≤20
Indice de réfraction à 20 0c	1.463-1.472
Indice de saponification	189-199.1
Insaponifiable %	≤1.1
Teneur en eau et matières volatiles % m/m	≤0.2
Teneur en impuretés %m/m	≤0.3

### 2.2.2. La Composition de l'huile d'argan

L'huile d'argan a une composition particulière, elle est caractérisée par des taux élevés d'acides linoléique et oléique. De plus, elle est riche en polyphénols et en tocophérols, présentant une activité antioxydante. L'huile d'argan contient aussi d'autres composés mineurs tels que les caroténoïdes, les squalènes, les stérols et les xanthophylles. Ces composés pourraient contribuer à la valeur nutritionnelle de l'huile d'argan, à ses propriétés bénéfiques pour la santé, ainsi qu'à ses caractéristiques organoléptiques et diététiques et à sa conservation (Cherki *et al.*, 2006; Khallouki *et al.*, 2003; Marfil *et al.*, 2008).

#### ➤ La Fraction glycéridique (saponifiable) de l'huile d'argan

La fraction triglycéridique représente 99% de l'huile d'argan, dont les triglycérides sont largement majoritaires avec 95 %. L'analyse des acides gras de l'huile d'argan montre une prédominance de l'acide oléique et l'acide linoléique, près de 80%, qui ont la particularité d'être en proportions équilibrées dans l'huile d'argan par rapport aux autres huiles naturelles (Cherki *et al.*, 2005). Les principaux triglycérides trouvés dans l'huile d'argan (Hilali *et al.*, 2005) sont décrits dans le Tableau 3.

**Tableau 3 :** Pourcentage des triglycérides majeurs trouvés dans l'huile d'argan (Hilali *et al.*, 2005)

TG	%	TG	%	TG	%
LOO	13,7-16,3	OOO	9-14,9	LLP	5,8-6,6
LOP	12,6-14,6	POO	14,9-17,4	SOO	4,1-6
LLO	11,5-16,7	LLL	5,8-8,1	OPP	3,6-5,2

L'huile d'argan est riche en acide gras insaturés : les acides gras mono-et poly-insaturés représentent 80 % environ des acides gras totaux : l'acide oléique (C 18:1), représentant 45 % des acides gras, l'acide linoléique (C 18:2 n-6), dont la part est de 35 %, l'acide palmitique (C 16:0) avec 12 % environ et l'acide stéarique (C 18:0), à hauteur de 5 % environ (Dubois *et al.* 2007 ; Hilali *et al.* 2005 ; Kazantzis *et al.* 2003). Les autres acides gras sont trouvés à l'état de traces (Norme marocaine homologuée de corps gras. 2002) (Tableau 4).

**Tableau 4 :** Pourcentage des acides gras dans l'huile d'argan (Hilali *et al.* 2005 ; Kazantzis *et al.* 2003).

Acide	%	Acide	%	Acide	%
Oleique	43-49	Linoleique	29-36	Palmetique	11-15
Stearique	4-7	Palmitoleique	0,3-3	Arachidique	<0,5
Linolenique	<0,2	Behenique	<0,2	Myristique	<0,1

#### ➤ La Fraction insaponifiable de l'huile d'argan

La fraction insaponifiable représente 1% de l'huile d'Argan, et elle est caractérisée par une composition riche en stérols et en antioxydants tels que les polyphénols et plus particulièrement les tocophérols (Khallouki *et al.*, 2003).

La composition de cette fraction insaponifiable est influencée par l'origine géographique et le processus d'extraction de l'huile d'argan (Hilali *et al.*, 2005).

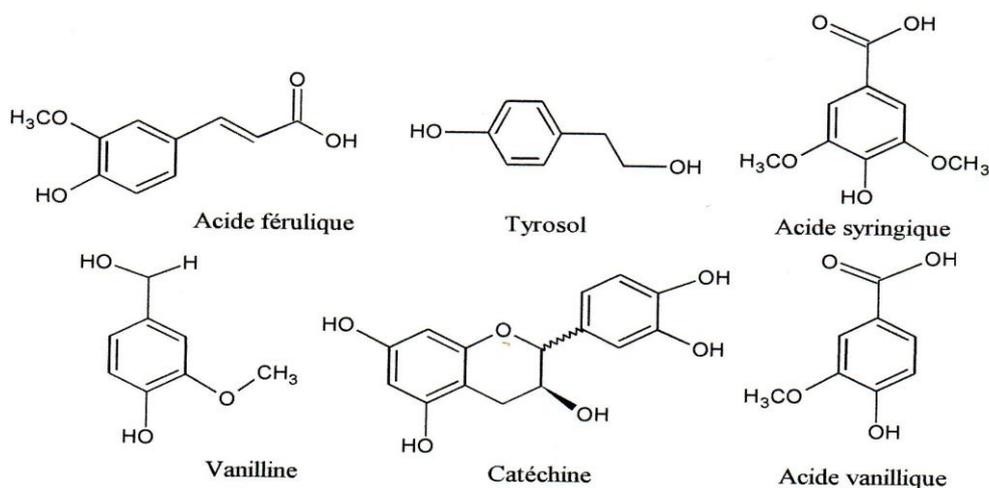
##### a. Les polyphénols

Les polyphénols présents dans les huiles sont des molécules bioactives qui ont une activité antioxydante. Ils sont principalement responsables de la prévention contre l'autooxydation des acides gras insaturés, ce qui augmente la durée de vie de ces huiles.

La composition phénolique de l'huile d'argan (Tableau 5) est caractérisée par la présence de quatre polyphénols, acide vanillique, acide syringique, acide férulique et le tyrosol. Avec une prédominance de l'acide férulique qui représente plus que 94% de la fraction des polyphénols (Khallouki *et al.*, 2003). Cependant, La teneur en polyphénols dans l'huile d'Argan (3263µg/Kg) est inférieure à celle de l'huile d'olive (793mg/Kg), par contre elle est supérieur à celle des autres huiles végétales comestibles. Les propriétés pharmacologiques de l'huile d'argan sont généralement attribuées à ses composés phénoliques (Pellegrini *et al.*, 2003).

**Tableau 5 :** Les Composés phénoliques quantifiés de l'huile d'argan (Khallouki *et al.*, 2003)

Composés phénoliques	( $\mu\text{g/kg}$ )
<b>Acide Vanillique</b>	67
<b>Acide Syringique</b>	37
<b>Acide Ferulique</b>	3147
<b>Tyrosol</b>	12
<b>Total</b>	<b>3263</b>

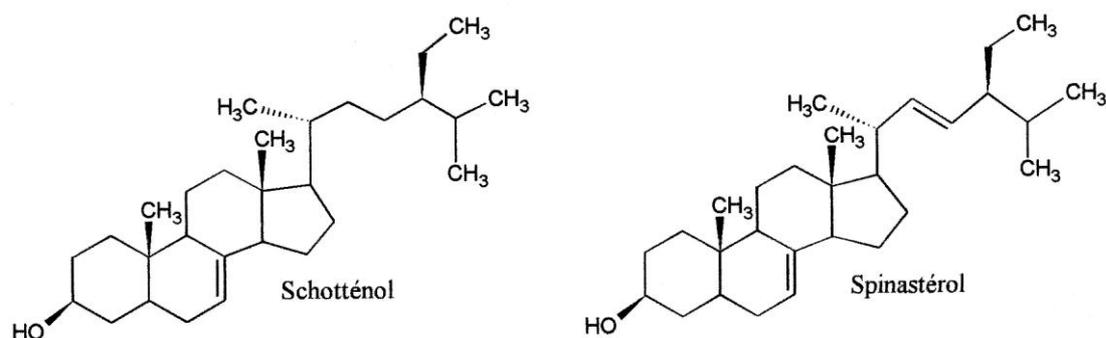
**Figure 20 :** Quelques composés phénoliques isolés de l'huile d'argan (Khallouki *et al.*, 2003).

### b. Les stérols

L'une des particularités des huiles d'argan est la présence des stérols spécifiques (le Spinastérol et Schotténol) qui ne sont pas présents dans les huiles d'olive et de tournesol (Khallouki *et al.*, 2003). L'huile d'Argan contient 5 stérols (Tableau 7), dont les deux principaux sont le Spinastérol et le Schotténol, les trois autres le stigma-8,22-dien-3-ol, et le stigma-7,24-dien-3-ol ainsi que le Campesterol sont présents en faible quantité (Hilali *et al.*, 2005).

**Tableau 6:** La Composition en stérols de l'huile d'argan (Hilali et al.,2005)

<b>Schotténol</b>	<b>44 - 49 %</b>
<b>Spinastérol</b>	<b>34 - 44 %</b>
<b>7 avénastérol</b>	<b>4 – 7 %</b>
<b>Stigmastadiène</b>	<b>3.2 – 5.7 %</b>
<b>Campestérol</b>	<b>0.4 %</b>
<b>Stérols totaux</b>	<b>170 mg/100g</b>

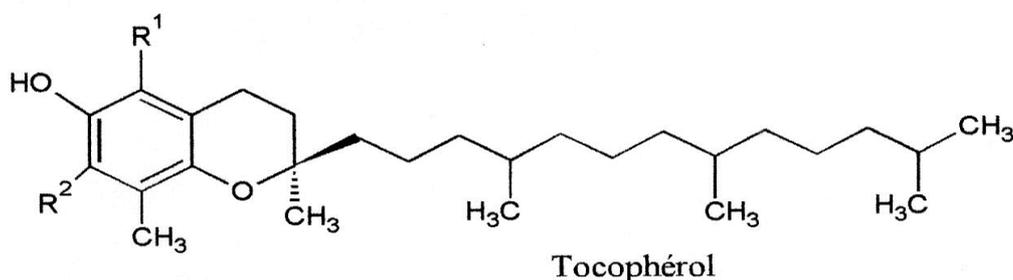
**Figure 21 :** Principaux stérols de l'huile d'argan (Charrouf, 1999).

### c. Les tocophérols

Les tocophérols sont des antioxydants naturels, rencontrés dans les huiles végétales sous quatre formes, l' $\alpha$ -tocophérol (vitamine E), le  $\beta$ -tocophérol, le  $\gamma$ -tocophérol et le  $\delta$ -tocophérol. L'huile d'argan est deux fois plus riche en tocophérol que l'huile d'olive, en particulier le  $\gamma$ -tocophérol qui représente la partie majoritaire avec plus que 75% des tocophérols totaux (Khallouki et al., 2003). La composition en tocophérols est très variable d'une étude à l'autre, selon le procédé utilisé d'extraction de l'huile d'argan et de l'origine géographique des fruits (Tableau 7).

**Tableau 7:** Les tocophérols de l'huile d'argan (Khallouki et al., 2003)

<b><math>\alpha</math>-tocophérol</b>	<b>2,4-4,8 %</b>
<b><math>\beta</math>-tocophérol</b>	<b>0,1-0,2 %</b>
<b><math>\gamma</math>-tocopherol</b>	<b>81-89 %</b>
<b><math>\delta</math>-tocophérol</b>	<b>6,2-8,2 %</b>
<b>Tocophérols totaux</b>	<b>600-700 mg/100g</b>



**Figure 22 :** Structure des tocophérols

### 2.3. Intérêts thérapeutiques de l'huile d'argan

#### 2.3.1. En Médecine traditionnelle

Dans les zones de sa production, l'huile d'argan, est non seulement une huile alimentaire et diététique mais aussi utilisée pour ses qualités thérapeutiques en médecine traditionnelle.

Les effets bénéfiques et thérapeutiques de la consommation de l'huile d'argan sont revendiqués depuis plusieurs siècles. Diverses propriétés biologiques largement reconnues par la médecine traditionnelle ont reçu une confirmation scientifique. Notamment, pour les utilisations traditionnelles de l'huile d'argan pour diminuer le cholestérol et l'hypertension artérielle (Berrada *et al.*, 2000; Berrougui *et al.*, 2003; Drissi *et al.*, 2004) ou pour traiter les maladies de peau comme l'acné juvénile et les pustules de la varicelle (Charrouf et Guillaume, 1999). D'autres effets bénéfiques, notamment analgésiques et anti-inflammatoires (Alaoui *et al.*, 1998), des propriétés anti-microbiennes et lipolytique (Charrouf et Guillaume, 1999) ont été également décrits pour des dérivés de saponine.

#### 2.3.2. La Prévention des maladies cardiovasculaires

La composition riche de l'huile d'argan en acide gras mono et polyinsaturés, en stérols ainsi qu'en antioxydants (1%) tels que les polyphénols et les tocophérols (Khallouki *et al.*, 2003) lui confère un effet préventif contre les maladies cardiovasculaires (Benajiba *et al.*, 2002). En effet, chez l'homme des enquêtes épidémiologiques menées au Maroc sur des sujets consommateurs de l'huile d'argan ont mis en évidence une diminution de 50% du risque de développer une hypertension artérielle (Berrougui *et al.*, 2004), un taux plasmatique élevé pour la vitamine E et des taux en triglycéride et en LDL inférieurs à ceux des sujets qui ne

consomment pas cette huile (Drissi *et al.*, 2004). Les études de Derouiche *et al.* ont montré que la consommation de l'huile d'Argan ou de l'huile d'olive induit une augmentation des taux de HDL plasmatiques, mais seule la consommation d'huile d'Argan entraîne une diminution significative (17,5 %) du taux de triglycérides plasmatiques (Derouiche *et al.*, 2005a). Par ailleurs, chez le rat hypertendu traité à l'huile d'argan, les données montrent une diminution de la pression artérielle systolique et diastolique (Berrougui *et al.*, 2004). Ceci est accompagné par une diminution de 37 % du taux de cholestérol sanguin, de 67 % des LDL, de 31 % des triglycérides et de 13 % du poids corporel. L'ensemble de ces résultats suggère que l'huile d'argan pourrait être utilisée dans une approche de prévention nutritionnelle pour prévenir et/ou retarder la progression des maladies cardiovasculaires (Berrougui *et al.*, 2003).

### 2.3.3. La Prévention du diabète

Chez l'homme, jusqu'à présent aucune étude n'a été faite pour évaluer l'effet bénéfique de l'huile d'argan sur le diabète. Cependant, quelques études chez l'animal montrent que cette huile pourrait avoir un effet antidiabétique. Ces effets observés sont attribués à son profil en acides gras et sa haute teneur en tocophérols et en acide férulique qui améliorent le statut antioxydant au niveau des tissus. Actuellement, au sein de la communauté scientifique, l'intérêt pour l'huile d'argan et pour ses effets physiologiques s'est considérablement développé, ce qui a eu pour résultat de faire passer le statut de cette huile d'un produit alimentaire diététique à celui d'un produit très prisé pour ces qualités antioxydantes et nutritionnelles. Cependant, bien qu'un certain nombre d'études ont déterminé le rôle bénéfique et préventif de la consommation de l'huile d'argan pour les maladies cardiovasculaires, le cancer et les diabètes, les bases moléculaires de ces effets restent à élucider. En effet, la composition de l'huile d'argan en acides gras et en antioxydants lui confère la possibilité d'avoir des effets bénéfiques sur le métabolisme lipidique ainsi qu'un potentiel préventif anti-inflammatoire (Samane *et al.*, 2006; Samane *et al.*, 2009).

## MATÉRIELS ET MÉTHODES

### 1. Matériels et méthodes des tests phytochimiques

#### 1.1. Matériel végétale

Les fruits de l'arganier ont été récoltés en juillet 2011 de la région d'oued Elma (la wilaya de Tindouf). Sont d'abord dépulpés, les amandes sont broyées en poudre fine, l'extraction de l'huile à partir des amandes de l'arganier à été réalisé par la méthode artisanale traditionnelle.

#### 1.2. Les Caractéristiques physico-chimiques

Nous avons déterminé quelques indices chimiques qui caractérisent les matières grasses, nous avons utilisé les normes AFNOR (Association Française de Normalisation) (AFNOR, 1984). Ces indices permettent de faire quelques estimations sur les masses moléculaires moyennes des acides gras et des triglycérides déterminés par l'indice de saponification (I.S), sur le nombre des insaturations par la mesure de l'indice d'iode (I.I) et sur la teneur en acides gras libres par la détermination de l'indice d'acide (I.A).

- **Indice d'acide (I.A) et acidité**

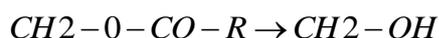
L'indice d'acide d'un corps gras est la quantité de potasse exprimée en milligramme nécessaire pour neutraliser les acides gras libres contenus dans un gramme de corps gras.

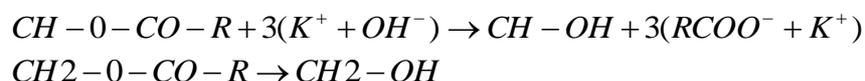


C'est un dosage qui nous permet de connaître le degré d'altération de l'huile et d'estimer le taux d'acides gras libres dans l'huile exprimé en acide oléique (Perrin, 1992) (Annexe 01).

- **Indice de saponification (I.S)**

Il correspond au nombre de milligrammes d'hydroxyde de potassium nécessaires pour la Saponification d'un gramme de corps gras suivant la réaction chimique suivante :





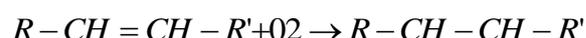
La valeur de l'indice de saponification nous permet d'estimer les longueurs des chaînes de carbone des acides gras constituant l'huile d'une part, et de calculer les masses moléculaires moyennes des acides gras et des triglycérides qui renferment l'huile (Annexe 01).

- **Indice d'iode (I.I)**

L'indice d'iode (I.I) d'une matière grasse est le nombre de grammes d'halogène exprimé en iode fixé par 100 grammes de corps gras. Le principe de sa détermination est basé sur la fixation d'halogènes par les doubles liaisons des acides gras insaturés, il permet donc d'évaluer le taux des insaturations moyennes de l'huile (Mordet, 1992) (Annexe 01).

- **Indice de peroxyde**

L'indice de peroxyde permet d'évaluer la quantité de peroxyde présent dans un corps gras, ce qui renseigne sur le taux d'acides gras rances. Cet indice correspond à la teneur en oxygène actif du peroxyde présent dans le corps gras et susceptible d'oxyder l'iodure de potassium avec libération d'iode. Au contact de l'oxygène les acides gras insaturés s'oxydent par fixation d'oxygène et forment les peroxydes, comme il est indiqué dans la réaction suivante :



Cet indice est souvent exprimé en millimoles ou milliéquivalents d'oxygène actif par kg de corps gras (Annexe 01).

### 1.3. Dosage des composés phénoliques de l'huile d'argan

La teneur en composés phénoliques de l'huile d'argan a été estimée par la méthode de Folin-Ciocalteu selon (Li *et al.*, 2007) (Annexe 01).

### 1.4. Dosage des Flavonoïdes de l'huile d'argan

La méthode du trichlorure d'aluminium (Bahorun *et al.*, 1996) est utilisée pour quantifier les flavonoïdes dans l'huile d'argan (Annexe 01).

### 1.5. Dosage des Tanins condensés de l'huile d'argan

Le dosage des tanins condensés dans l'huile d'argan est effectué selon la méthode de Broadhurst et Jones (1978), modifiée par Heimler *et al.* (2006) (Annexe 01).

### 1.6. Effet scavenger du radical DPPH *in vitro*

Selon le protocole décrit par Kirby *et al.* (2005). Dans ce test les antioxydant réduisent le diphényl picryl-hydrate ayant une couleur violette en un composé jaune, le diphényl picryl-hydrazine, dont l'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des protons (Sauchez, 2002) (Annexe 01).

## 2. Matériels et méthodes des tests biologiques

L'objectif de cette partie a été focalisé sur l'étude de l'effet protecteur de l'huile d'argan et de sélénium sur la toxicité induite par le mercure afin de voir s'il ya un bénéfice d'utiliser ces deux antioxydant.

### 2.1. Matériel biologique et conditions d'élevage

Nous avons utilisé 128 rats blancs *Rattus* de la souche *Wistar*, provenant de l'institut Pasteur d'Alger. Agés de 8-9 semaines, d'un poids vif moyen de 220 g. Ce sont des mammifères de l'ordre des rongeurs, largement utilisés dans divers domaines de recherche.

Ces rats ont été soumis à une période d'adaptation d'un mois environ, aux conditions de l'animalerie; à une température de  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}$  et une photopériode naturelle.

Les rats sont élevés dans des cages en plastique qui sont tapissées d'une litière constituée de copeaux de bois. Les cages ont été nettoyées et la litière changée tous les jours jusqu'à la fin de l'expérimentation. Ils ont été nourris avec un concentré énergétiquement équilibré, dont la composition est détaillée dans le tableau 8.

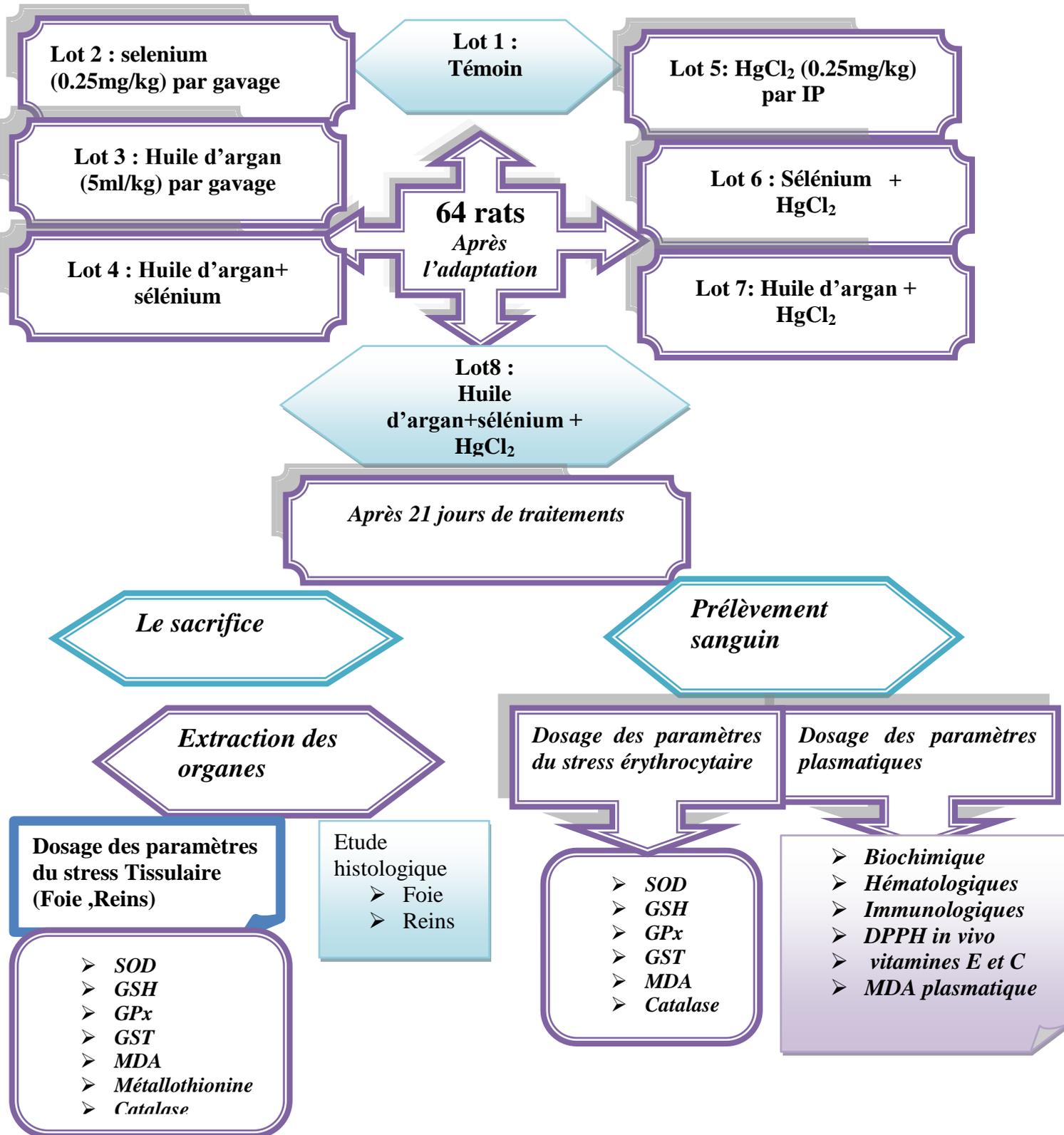
**Tableau 8 : Composition du régime alimentaire pour 1 kg d'aliment (Upreti *et al*, 1989).**

Matière alimentaire	Quantité en g/kg d'aliment	Pourcentage (%)
<i>Mais</i>	420	42
<i>Soja</i>	260	26
<i>saccharose</i>	210	21
<i>Huile</i>	20	2
<i>Son</i>	60	6
<i>VMV</i>	30	3

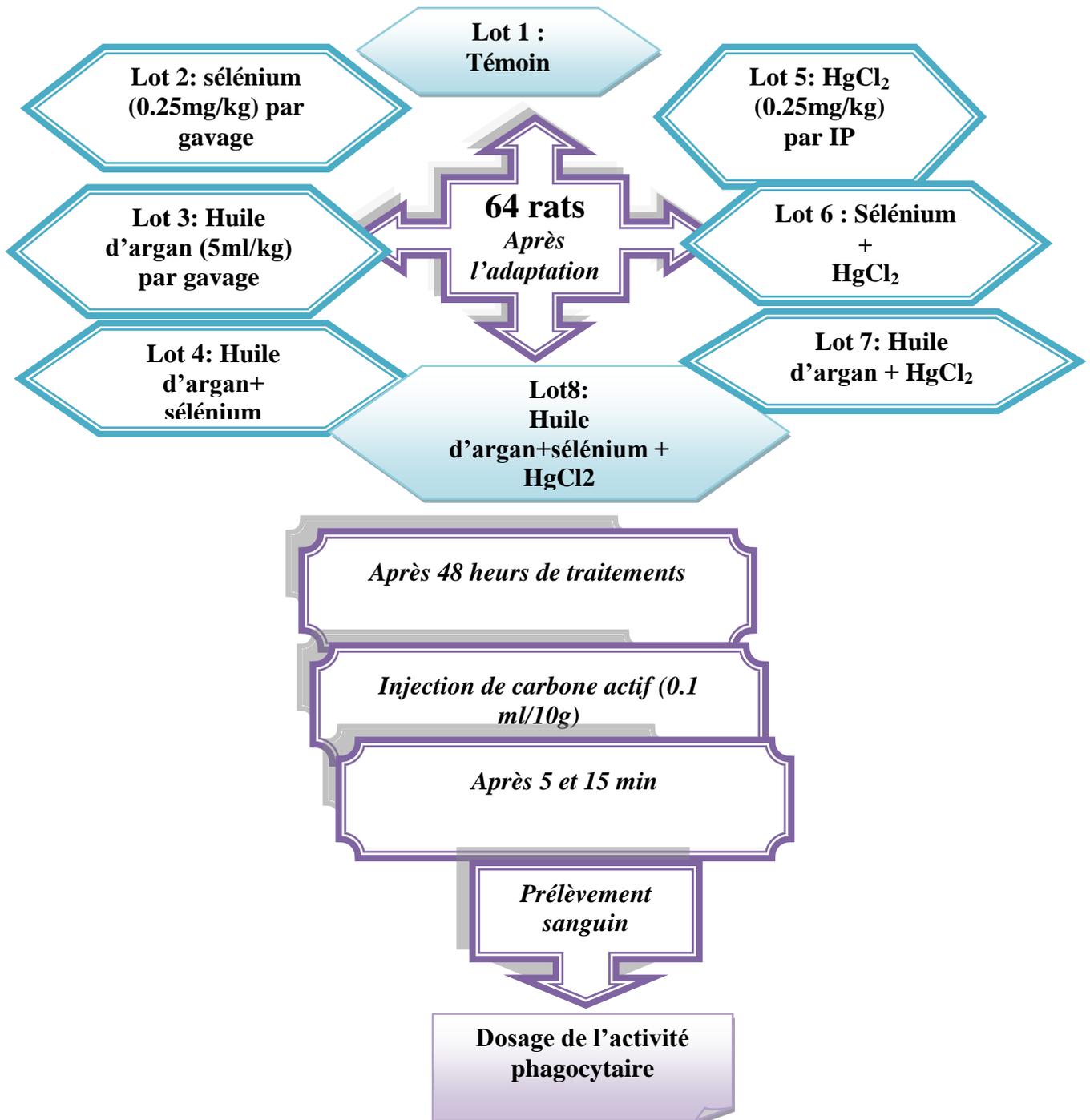
## 2.2. Traitement des rats

Les figures 23 et 24 illustrent les différentes étapes du protocole expérimental :

## Protocole de travail



**Figure 23 :** Schéma récapitulatif du protocole expérimental.



**Figure 24 :** Schéma récapitulatif du protocole expérimental de dosage de l'activité phagocytaire.

## 2.3. Les Méthodes de dosage

### 2.3.1. Dosage des paramètres biochimiques et hématologiques

Le dosage des paramètres biochimiques et hématologiques ont été accompli au sein d'un laboratoire d'analyse médicale à Annaba à l'aide d'un automate analyseur sanguin automatisé.

### 2.3.2. Oxydation in vitro des lipoprotéines et dosage des diènes conjugués

L'oxydation in vitro des lipoprotéines plasmatiques, induite par les métaux (cuivre) est déterminée par le suivi au cours du temps de la formation des diènes conjugués selon la méthode d'Esterbauer *et al.* (1989) (Annexe 02).

### 2.3.3. Dosage des paramètres immunologiques

Les paramètres immunologiques sont analysés au niveau de laboratoire physiologie animal à l'université Badji Mokhtar Annaba selon la méthodologie d'ELIZA.

- **Dosage des Interleukines 1 (IL-1)**

Le dosage des interleukines 1 (IL-1) se fait selon le protocole du kit ELISA ((Boster, immuloleader, UK). Pour IL1. Le principe est basé sur l'utilisation de deux anticorps : un anticorps monoclonal anti IL1. Et un polyclonal conjugué à la biotine. un revêtement d'anticorps monoclonal anti-IL1, est administré dans les micropuits de la plaque ELIZA. L'IL1 présente dans l'échantillon ou le standard, se lie aux anticorps adsorbés dans les micropuits l'anticorps anti-IL1 polyclonal conjugué à la biotine est ajouté et lie à IL1 capturés par le premier anticorps. L'anti-IL1 conjugué à la biotine non lié est enlevé pendant l'étape de lavage. La streptavidine-HRP est ajoutée et se lie à l'anti-IL1 conjugué à la biotine, pour l'incubation suivante, la streptavidine-HRP non lié est enlevé durant le lavage, et la solution de substrat réagissant avec le HRP est ajoutée aux puits. Un produit est formé dans l'échantillon. La réaction est terminée par l'addition d'acide et l'absorbance est mesurée à 450 nm (Annexe 02).

- **Dosage des Interleukines 6 (IL-6)**

Le principe du dosage des interleukines 6 (IL-6) repose sur l'utilisation d'un anticorps monoclonal anti-IL-6 et un polyclonal anti- IL-6 conjugué à la biotine. La technique utilisée est comparable à celle du dosage des IL-1. La gamme étalon est préparée à partir d'un standard IL-6 (Boster, immuloleader UK) (Annexe 02).

- **Dosage de Facteur nécrosant des tumeurs  $\alpha$  (TNF $\alpha$ )**

Le principe du dosage de Tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) repose sur l'utilisation d'un anticorps monoclonal anti-TNF $\alpha$  et un polyclonal anti- TNF $\alpha$  conjugué à la biotine. La technique utilisée est comparable à celle du dosage des IL-1 et IL-6. La gamme étalon est préparée à partir d'un standard TNF $\alpha$  fourni dans le Kit (Boster, immuloleader UK) (Annexe 02).

- **Dosage de l'activité phagocytaire**

L'activité phagocytaire est exprimée par l'index phagocytaire K qui mesure toute la fonction de l'ensemble de système R.E au contact du sang circulant et le taux d'élimination est exprimé comme la période de demie -vie du carbone dans le sang (t1/2) (Annexe 02).

#### **2.3.4. Dosage de Malondialdéhyde (MDA) plasmatique**

Le dosage des TBARs permet d'estimer le niveau de la peroxydation lipidique. Le principe de ce dosage repose sur la liaison en milieu acide (PH=2à3) et chaud du MDA avec deux molécules d'acide thiobarbiturique (TBA) pour former un pigment rosé, le complexe MDA-(TBA)<sub>2</sub> qui absorbe à une longueur d'onde 532nm (Richard *et al.*, 1992) (Annexe 02).

#### **2.3.5. Evaluation de la capacité antioxydante plasmatique**

- **Dosage de la vitamine C**

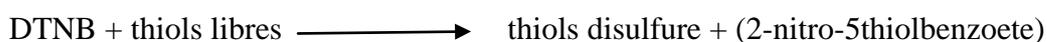
La vitamine C plasmatique est dosée selon la méthode de Jagota et Dani (1982) utilisant le réactif de Folin et une gamme d'acide ascorbique (Annexe 02).

- **Dosage de la vitamine E**

La vitamine E plasmatique est dosée selon la méthode de (Rutkowski *et al.*, 2005) (Annexe 02).

- **Dosage des thiols plasmatique**

L'oxydation des protéines plasmatique était évaluée par la disparition des groupements thiols des protéines. Le principe de ce dosage repose sur la mesure des groupements thiols réagissant avec le DTNB pour former du 2-nitro-5thiobenzoate (TNB) coloré et absorbant à 412nm (Faure, 1995) (Annexe 02)



- **Dosage de radical DPPH in vivo**

La capacité du plasma à piéger le radical DPPH a été évaluée selon la méthode de Hasani et ses collaborateurs (2007) avec quelques modifications, en se basant sur le même principe que celui du test de DPPH effectué précédemment *in vitro* (Annexe 02).

### 2.3.6. Dosage de quelques paramètres du stress oxydant tissulaire et érythrocytaires

➤ **Préparation de l'homogénat**

0.5g de foie et des reins des différents groupes étudiés, à été utilisé. Après broyage et homogénéisation des tissus dans le tampon phosphate (0.1M, PH =7.8). On a procédé à une centrifugation de la suspension cellulaire (5000 tours/min, 4°C, 15min). Puis le surnageant obtenu est aliquote dans des tubes eppendorfs puis conservés à -20°C en attendant d'effectuer les dosages des paramètres du stress oxydatif.

➤ **Préparation des érythrocytes**

Le culot restant est lavé avec l'eau physiologique, Les débris cellulaire sont éliminés par centrifugation à 4000 tours/min pendant 10 minutes. Le lysat érythrocytaire est ensuite récupéré afin de doser les paramètres érythrocytaires du stress oxydatif.

- **Dosage du glutathion**

Le dosage du glutathion est réalisé selon la méthode de Wekbeker & Cory (1988) (Annexe 02).

- **Dosage de Malondialdéhyde (MDA)**

Le MDA peut être détecté par une réaction colorimétrique à l'acide thiobarbiturique (TBA). La détection du MDA issue de la dégradation des acides gras polyinsaturés à 3 ou 4 double liaisons peroxydées, constitue une méthode très sensible pour déterminer une lipoperoxydation *in vitro*. Le dosage du MDA est réalisé selon la méthode d'Ésterbauer *et al* (1992) (Annexe 02).

- **Dosage de la Métallothionéine (MTs) Tissulaire**

Le principe de la méthode repose sur la fixation des molécules de DTNB {5,5'-Dithiobis (2-nitrobenzoic acide)} aux groupements thiol (SH) a comme conséquence l'apparition d'une coloration jaune dont l'intensité est proportionnelle à la teneur en groupements SH contenus dans les MTs. La méthode utilisée de Viarengo *et al* (1997) modifiée par Petrovic *et al*. (2001) consiste à évaluer le nombre de groupements SH en utilisant comme référence le réactif GSH (Annexe 02).

- **Dosage de l'activité de la Superoxyde Dismutase (SOD)**

Le dosage de la superoxyde dismutase (SOD) est réalisé selon la méthode de Asada *et al* (1974) (Annexe 02).

- **Dosage de la glutathion peroxydase (GSH-Px)**

L'activité enzymatique du glutathion peroxydase (GSH-Px) a été mesurée par la méthode de Flohe and Gunzler (1984) (Annexe 02).

- **Dosage de la glutathion-S-transferase (GSTs)**

La mesure de l'activité des GST, consiste à fournir à l'enzyme un substrat en général du (CDNB) 1-chloro-2,4-dinitrobenzène, qui réagit facilement avec de nombreuses formes de

GST et du glutathion. La réaction de conjugaison de ces deux produits entraîne la formation d'une molécule nouvelle qui absorbe la lumière à 340nm de l'ongeur d'onde, La méthode utilisée dans cette étude pour doser les GSTs est celle de Habig *et al* (1974) (Annexe 02).

- **Dosage de la catalase**

L'activité catalase (CAT) a été mesurée selon la méthode de Aebi (1984) à 240nm à l'aide d'un spectrophotomètre par la variation de la densité optique consécutive à la dismutation du peroxyde ( $H_2O_2$ ) (Annexe 02).

- **Dosage des protéines tissulaire et érythrocytaires**

La concentration des protéines est déterminée selon la méthode de Bradford (1976) qui utilise le bleu de coomassie comme réactif. Ce dernier réagit avec les groupements amines ( $-NH_2$ ) des protéines pour former un complexe de couleur bleu (l'apparition de la couleur bleue reflète le degré d'ionisation du milieu acide et l'intensité correspond à la concentration des protéines) (Annexe 02).

### 2.3.7. L'étude histologique

Les coupes histologiques ont été réalisées au niveau de laboratoire d'anatomie NIHA D'Annaba. La technique utilisée est celle décrite par Houlot (1984) (Annexe 02).

## 2.4. Analyse statistique

Les résultats sont été représentés sous forme de moyenne plus ou moins l'écart type ( $X \pm SEM$ ). La comparaison entre les différents groupes est effectuée par le test *t* de student.

**a<sub>1</sub>** : Différence significative comparant au témoin ( $P \leq 0,05$ ).

**a<sub>2</sub>** : Différence hautement significative comparant au témoin ( $P \leq 0,01$ ).

**a<sub>3</sub>** : Différence très hautement significative comparant au témoin ( $P \leq 0,001$ ).

**b<sub>1</sub>** : Différence significative comparant au lot traité par chlorure de mercure ( $P \leq 0,05$ ).

**b<sub>2</sub>** : Différence hautement significative comparant au lot traité par le chlorure de mercure ( $P \leq 0,01$ ).

**b<sub>3</sub>** : Différence très hautement significative comparant au lot traité par le chlorure de mercure ( $P \leq 0,001$ ).

**P** : seuil de signification.





## 1. Résultats des tests phytochimiques

### 1.1. Les caractéristiques physicochimiques et dosage des composés phénoliques de l'huile d'argan

#### 1.1.1. Résultats

Les résultats illustrent dans le tableau 9 et 10 démontrent que l'huile d'argan possède valeurs égales à :  $1.9 \pm 0.01$ ,  $129.6 \pm 1.7$ ,  $183.2 \pm 1.28$  et  $2.4 \pm 0.03$  des indices d'acidité, d'iode, de saponification et de peroxyde respectivement. A partir de la courbe de l'acide gallique, de la quercétine et de la catéchine, nous avons déterminé la concentration des composés phénolique dans l'huile d'argan, ces valeurs égales à :  $1.24 \pm 0.38 \text{ mg}/100\text{g}$ ,  $0.8 \pm 0.01 \text{ mg}/\text{g}$  et  $0.29 \pm 0.02 \text{ mg}/\text{g}$  respectivement.

**Tableau 9:** Les caractéristiques physicochimique de l'huile d'argan

Les indices	Les valeurs
Indice d'acidité (%d'acide oléique)	$1.9 \pm 0.01$
Indice d'iode (g d'iode/100g d'huile)	$129.6 \pm 1.7$
Indice de saponification (mg de KOH/g d'huile)	$183.2 \pm 1.28$
Indice de peroxyde (meq d'O <sub>2</sub> /kg d'huile)	$2.4 \pm 0.03$

**Tableau 10 :** La Teneur des composés phénoliques dans l'huile d'argan

Les paramètres	Les valeurs
Les polyphénols (mg/100g)	$1.24 \pm 0.38^a$
Les flavonoides (mg/g)	$0.8 \pm 0.01^b$
Les tanins condensés (mg/g)	$0.29 \pm 0.02^c$

a)  $\mu\text{g}$  d'équivalent d'acide gallique par mg de l'huile

b)  $\mu\text{g}$  d'équivalent de quercétine par mg de l'huile

c)  $\mu\text{g}$  d'équivalent de catéchine par mg de l'huile

Les valeurs représentent la moyenne de trois (03) mesures  $\pm$  SEM

### 1.1.2. Discussion

L'indice d'acide (ou acidité) est un critère de qualité permettant de déterminer la teneur en acide gras qui renseigne sur l'activité des lipases, la stabilité de l'huile ainsi que sur la qualité du fruit. Les acides dérivent de l'hydrolyse des triglycérides.

La valeur d'acidité de notre huile d'argan est inférieure à celles décrites par la norme marocaine (NM08.50.90) qui les fixe entre 0.8 et 2.5% (Rahmani, 2005), d'après les résultats trouvés, l'acidité de nos huiles est très faible, ce qui leur confère une meilleure stabilité oxydative (Chimi, 2005). Les résultats de l'acidité de nos huiles confrontés à d'autres études (conduites sur les huiles marocaines) montrent que les valeurs sont très proches les unes des autres, ainsi dans l'étude menée par Hilali (2001) l'acidité des huiles testées oscillait entre 0.14 à 1.4. selon l'afssa (2002), les valeurs de l'acidité des huiles étaient de 0.49% à 1.3%, l'acidité semble être influencée aussi par le procédé d'extraction des huiles, selon l'étude conduite par charrouf (1998), l'acidité des huiles a atteint 1% (huile extraite par voie chimique) et 1.3% (huile extraite par voie traditionnelle). Fabre et al (1998) travaillant sur l'huile d'argan trouvent quant à lui, des valeurs d'acidité de l'ordre de 1.8%.

L'indice de peroxyde (IP) est un critère de qualité, il permet de voir l'état d'oxydation des huiles et de contrôler les premières étapes de l'altération oxydative (Chimi, 2005).

Les valeurs que nous avons obtenues sont inférieures à celles prescrites par la norme marocaine et qui sont inférieures à 20 meq d' $O_2$ /kg d'huile (Rahmani, 2005). De telles valeurs nous mènent à dire que nos huiles ne présentent aucun état d'oxydation. Certains auteurs ayant analysé l'IP des huiles d'argan marocaines trouvent des valeurs plus importantes que les notes, généralement ces valeurs varient de 0.25 à 4.1 meq d' $O_2$ /kg d'huile (Hilali, 2005) ou de 0.2 à 11 meq d' $O_2$ /kg d'huile (AFSSA, 2002).

L'indice de saponification (IS) renseigne sur la longueur des chaînes d'acide gras, il décroît avec l'augmentation de la longueur de ces chaînes. C'est un indice qui est très utile dans l'industrie des savons. Une huile qui se caractérise par un indice de saponification important, est une très bonne pour servir dans la fabrication du savon.

Les IS de nos huiles se rapprochent beaucoup des ceux signalés par d'autres auteurs comme charrouf (1998), AFSSA (2002), Hilali (2005). En effet, d'après les résultats de charrouf (1998) l'IS des huiles extraites par voie chimique avait une valeur moyenne avoisinant les 195 alors que celui des huiles extraites par voie traditionnelle était de l'ordre de 191.

D'après le classement des huiles, effectué par Karleskind (1992), en fonction des IS, nos huiles peuvent être rangées dans la catégorie des huiles de type acide oléique et linoléique.

L'indice d'iode est un critère de pureté qui informe sur la présence des liaisons éthyléniques ou acétyléniques des acides gras, ce qui permet de mesurer l'insaturation des corps gras. La valeur de l'indice d'iode (123g/100g) envisage une insaturation élevée dans l'huile.

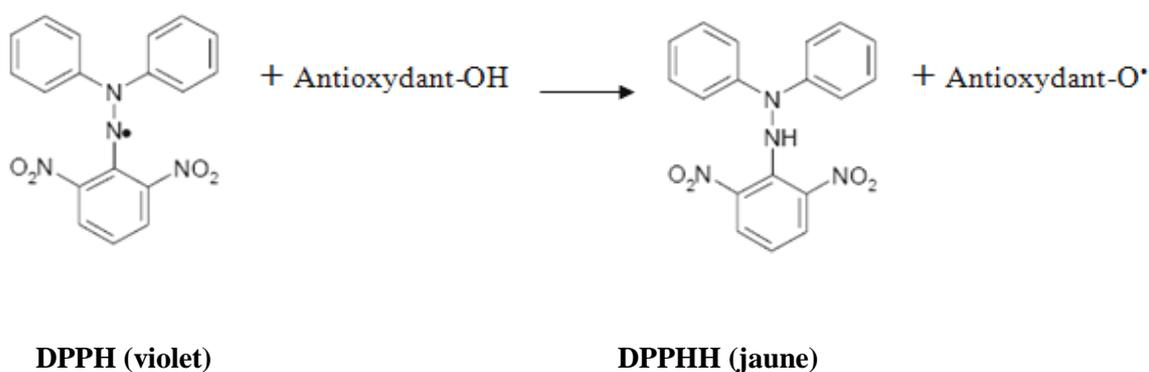
Nous avons comparé nos résultats avec ceux que l'on rencontre dans la littérature, nous avons des résultats analogues à ceux de nos prédécesseurs, les petites différences peuvent s'expliquer par la disparité d'origine des échantillons d'huile et leur mode d'extraction et de conservation.

La proportion des phénols dans l'huile d'argan est faible mais leur impact sur ses propriétés biologiques est très important. D'après Gharby *et al* (2011) l'huile d'argan renferme des acides cafeïques, vanilliques, syringiques, ferruliques. Les concentrations des polyphénols trouvées récemment pour l'huile d'argan alimentaire et cosmétique sont de 13.2 et 3.1 mg/kg respectivement, il semble que la majorité des polyphénols, des flavonoides et des tanins condensés contenus dans les amandons restent dans le tourteau et que la torréfaction ait une grande influence sur leur présence dans l'huile (Roja *et al.*, 2005).

## 1.2.L'activité antiradicalaire vis-à-vis de DPPH de l'huile d'argan et de sélénium

### 1.2.1. Résultats

L'activité antioxydante de l'huile d'argan et de sélénium *vis-à-vis* du radical DPPH a été évaluée spectrophotométriquement en suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne par son passage de la couleur violette à la couleur jaune mesurable à 517 nm (figure 25).



**Figure 25** : Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH.

Les profils d'activité antiradicalaire obtenus (Tableau 11) révèlent que l'huile d'argan et le sélénium possèdent une activité antiradicalaire faible contre la quercétine, les IC<sub>50</sub> de

chacun ont été déterminées. En revanche, l'activité antiradicalaire de l'huile d'olive est plus élevée. Pour mieux caractériser le pouvoir antiradicalaire, deux autres paramètres sont introduits :

- **Calcul de l'EC<sub>50</sub>** qui prend en considération la concentration de DPPH dans le milieu réactionnel [concentration effective à 50%,  $EC_{50} = (IC_{50} / \text{mg de DPPH/ml})$ ]
- **Calcul du pouvoir antiradicalaire (APR)** qui est inversement proportionnel à l'EC<sub>50</sub> ( $APR = 1/EC_{50}$ ) (Prakash *et al.*, 2007).

De plus, le test de DPPH effectué sur l'huile d'argan et le sélénium pour évaluer son effet scavenger a montré qu'il a une IC<sub>50</sub> de 13.33± 1.3, 144.66±31 et 0.126±0.04 contre 1.52±0.03.

**Tableau 11** : Activité antiradicalaire de l'huile d'argan et le sélénium vis-à-vis le DPPH

Les paramètres	IC <sub>50</sub> (µg/ml)	EC <sub>50</sub> (µg/µg DPPH)	PAR
<b>Huile d'olive</b>	0.126±0.04	0.0072±0.002	136.98±15
<b>La quercétine</b>	1.52±0.03	0.06±0.001	15.41±0.34
<b>Huile d'argan</b>	13.33±1.3	0.761±0.073	1.338±0.14
<b>Sélénium</b>	144.66±3.1	8.269±0.18	0.120±0.002

Les valeurs représentent la moyenne de trois essais (m ± SEM).

### 1.2.2. Discussion

L'évaluation de l'effet de l'huile d'argan et le sélénium contre le stress oxydant est un objectif principal dans notre étude, raison pour laquelle il était indispensable de l'étudier *in vitro* avant de passer à l'étude *in vivo*. Pour cela le test de l'effet scavenger de DPPH est réalisé.

Une étude pareille réalisée sur l'huile d'argan et ses fractions a jugé qu'il possède un effet scavenger très élevé (Yousfi *et al.*, 2009), il remarque que l'extrait phénolique de l'huile de l'arganier possède une activité antioxydante très importante (5.10-3mg/ml) par rapport aux autres extraits lipidiques, ainsi que le IC<sub>50</sub> de l'extrait lipidique de l'arganier est 3200 fois plus faible que celui de l'extrait phénolique de l'huile. Notre résultats indique que IC<sub>50</sub> de l'huile d'argan est plus faible que la quercétine. Cette large différence peut être expliquée du fait que les composés phénoliques sont masqués par les lipides. Cet effet justifie que les composés phénoliques sont les espèces moléculaires possédant la plus grande activité

antioxydante importante vis-à-vis du radical stable DPPH, on note aussi que le sélénium possède un faible pouvoir antiradicalaire. En revanche l'huile d'olive est beaucoup plus puissante comme antioxydant que l'huile d'argan et le sélénium. Par comparaison à cette étude, on peut dire que l'effet scavenger de l'huile d'argan de nos études est aussi très élevé. Notre résultat est en accord avec les travaux de Ramadan et son équipe (2003). Cette étude a été menée sur l'huile fixe des graines de nigelle et ses fractions, L'activité antiradicalaire manifestée par l'huile brute a été interprétée par une action combinée des différents antioxydants endogènes contenus dans l'huile et elle est corrélée avec la teneur en acides gras polyinsaturés, en composés insaponifiables et en phospholipides.

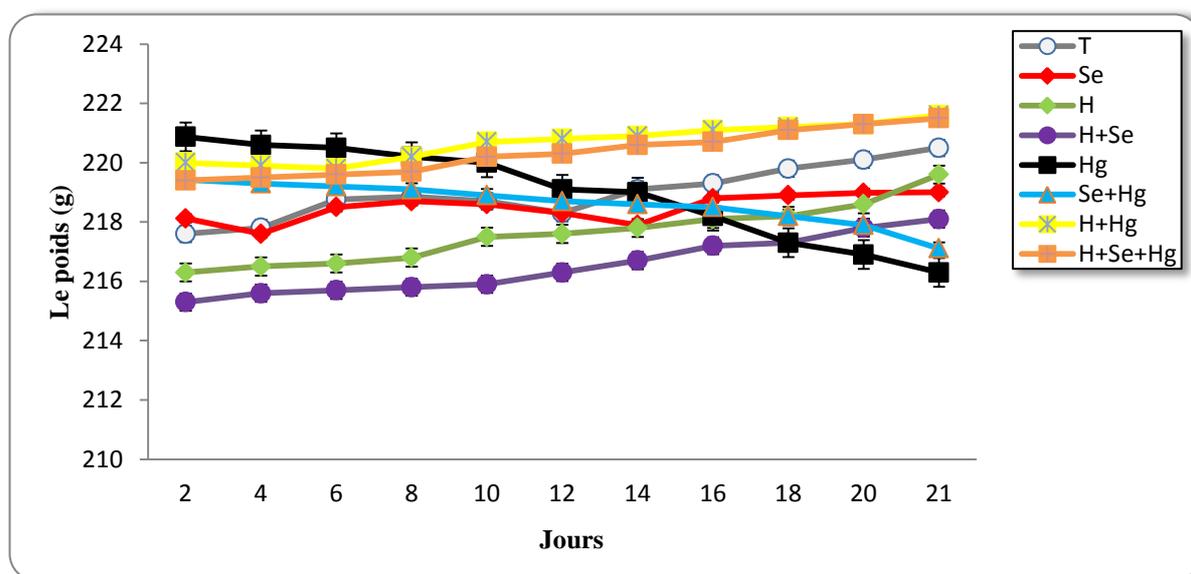
## 2. Résultats des tests biologiques

### 2.1. Influence du traitement sur les variations du poids corporel et pondérales des organes

#### 2.1.1. Résultats

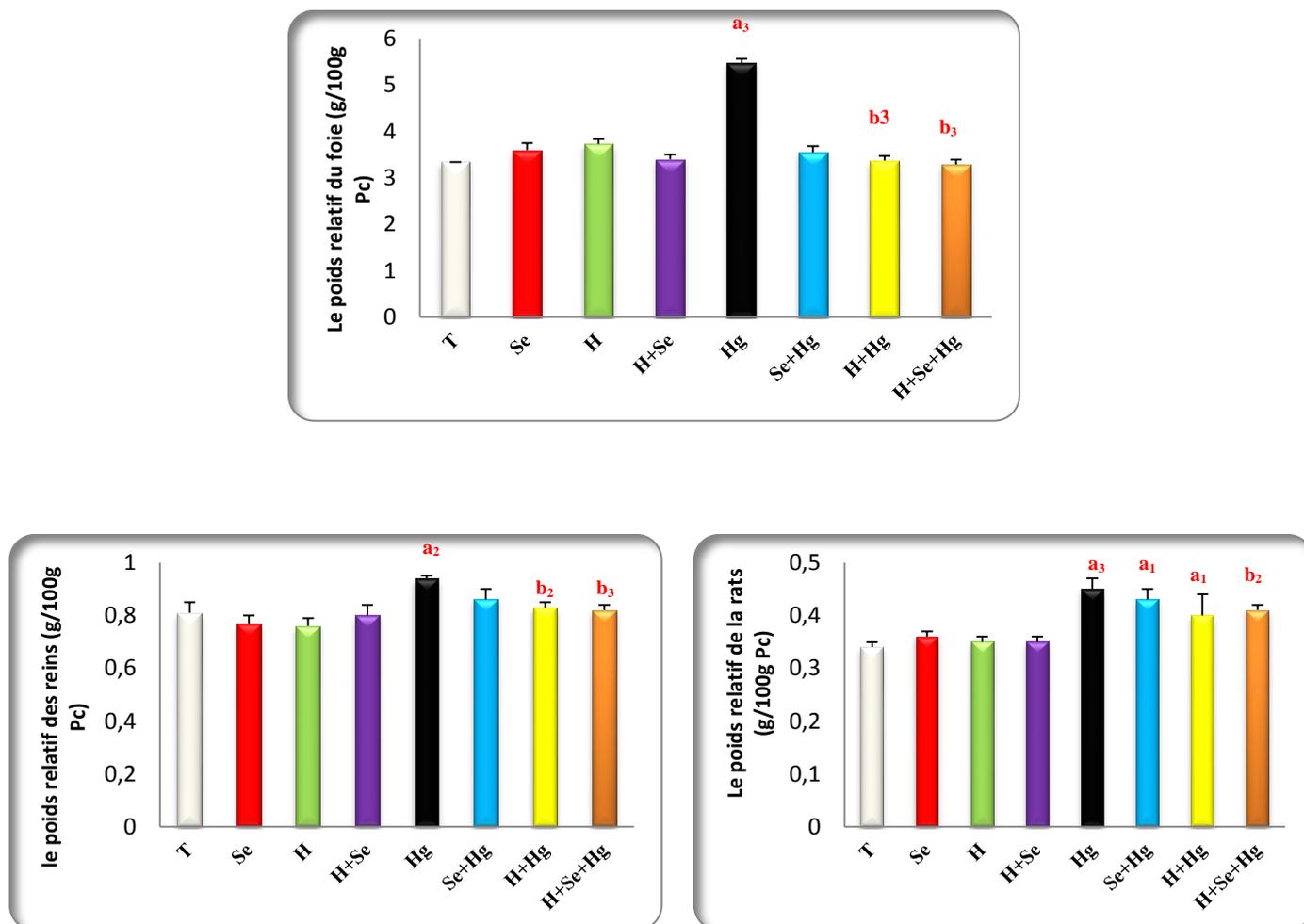
Nos résultats montrent l'existence d'une diminution non significative du poids corporel, et une diminution du gain du poids chez les lots de traitement par rapport au témoin.

On note aussi une augmentation du poids corporels et une augmentation dans le gain du poids de façon non significative chez le lot traité par la combinaison H/Hg, Se/Hg et H+Se/Hg on comparant au lot traité par le mercure seul (fig. 26, annexe 06).



**Figure 26 :** Evaluation en fonction du temps (Jours), le poids corporel (g) chez le lot témoin et les lots traités par le Se, H, Se/H, Hg, Se/Hg, H/Hg et H +Se /Hg après 21 jours de traitement.

L'étude statistique de la variation des poids des organes par rapport 100g du poids corporel a montré qu'il y a une différence très hautement (le foie, la rate) et hautement significative (les reins) chez le lot traité par le mercure. On note aussi une augmentation non significative (foie et les reins) et significative (la rate) chez les rats traités par la combinaison se/Hg, H/Hg et H+Se/Hg. en revanche on registre, une diminution très hautement significative (foie) et significative (reins et la rate) chez les rats traités par la combinaison H/Hg, Se/Hg et H+Se/Hg par rapport au lot traité par le mercure seul (fig. 27, annexe 07 ).



**Figure 27 :** Variation des poids relatifs du foie, des reins et de la rate chez le lot témoin et les lots traités par le Se, H, Se/H, Hg, Se/Hg, H/Hg et H +Se /Hg après 21 jours de traitement.

**a<sub>1</sub>** : Différence significative comparant au témoin ( $P \leq 0,05$ ).

**a<sub>2</sub>** : Différence hautement significative comparant au témoin ( $P \leq 0,01$ ).

**a<sub>3</sub>** : Différence très hautement significative comparant au témoin ( $P \leq 0,001$ ).

**b<sub>2</sub>** : Différence hautement significative comparant au lot traité par le chlorure de mercure ( $P \leq 0,01$ ).

**b<sub>3</sub>** : Différence très hautement significative comparant au lot traité par le chlorure de mercure ( $P \leq 0,001$ ).

### 2.1.2. Discussion

D'après nos résultats, le gain du poids corporel des rattes a été affecté par le mercure. En effet, nous avons remarqué une diminution de la croissance des rats traités au mercure comparativement aux témoins. Ceci est en accord avec les constatations de (Necib *et al.*, 2013i). Cet effet peut être expliqué par l'action du mercure sur le transport des éléments nutritifs (les acides aminés, le glucose et les minéraux essentiels comme le sélénium, le zinc, le magnésium et le fer...) par le sang et par conséquent, ils peuvent induire une mauvaise assimilation des aliments par le Corps.

Simons *et al* (1995) ont signalé que l'augmentation des poids absolus ou relatifs des organes des animaux est un indicateur de la toxicité par les substances toxiques utilisées. Dans notre étude, le mercure a augmenté les poids relatifs de foie, des reins et de la rate, ceci s'explique par l'accumulation du mercure dans ses organes cibles aux métaux lourds (Agarwal *et al.*, 2007).

L'addition du sélénium aux rats traités au mercure, ont eu tendance à améliorer le gain du poids, portant ce n'est considérable. Une action protectrice semblable du sélénium à améliorer le poids corporel des animaux traités au CCL<sub>4</sub> dans une autre étude et qui induit des blessures de foie (Amara *et al.*, 2008).

La prévention de la perte du poids chez les rats traités par le mercure avec l'huile d'argan, peut être due à la régulation de l'homéostasie de glucose, à l'effet hypoglycémique, ou à la réduction des lipides (Tastekin *et al.*, 2006), la capacité de renverser la néoglucogénèse et la prévention de la perte protéique peuvent être aussi à l'origine de la prévention de la perte du poids (Rajagopal et Ssikala, 2008), notre résultats et en accord avec les travaux de Berrougui *et al* (2003) qui ont trouvé une diminution dans le poids corporel des rats traités par l'huile d'argan pendant 7 semaines à une dose 10 ml/kg chez le rat.

## 2.2. Influence du traitement sur les variations des paramètres biochimiques sériques

### 2.2.1. Résultats

Les résultats démontrent une augmentation non significative de la concentration sérique du glucose chez les lots traités par le mercure et à la combinaison (H/Hg, Se/Hg, H+Se/Hg) en comparaison au lot témoin. En revanche, on constate une diminution significative et non significative chez le lot traité par la (H/Hg, Se/Hg, H+Se/Hg) respectivement en comparaison au groupe traité par le mercure seul.

L'analyse de la concentration sérique de l'urée révèle l'existence d'une augmentation très hautement significative (Hg, Se/Hg) et non significative (H/Hg, H+Se/Hg) par rapport le lot témoin. Cependant, on constate une diminution très hautement significative chez les lots traités par H/Hg, Se/Hg et H+Se/Hg par rapport le lot traité par le mercure seul.

Les résultats montrent aussi que la concentration sérique d'acide urique a augmenté de façon très hautement significative (H/Hg, Se/Hg) et non significative (H+Se/Hg) en comparaison au lot témoin. Par contre, on observe une diminution très hautement significative chez les lots traités par Se/Hg, H/Hg et H+Se/Hg par rapport le lot traité par le mercure seul.

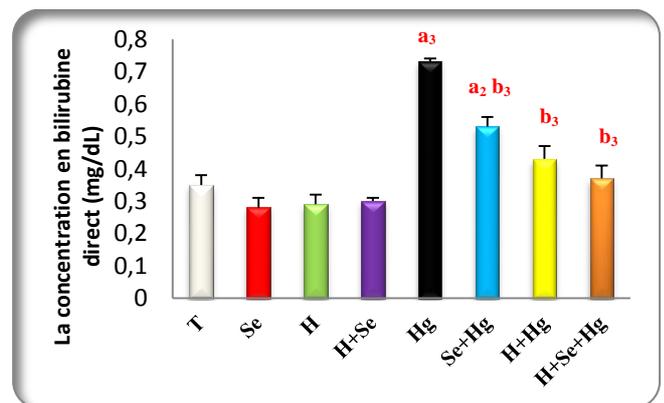
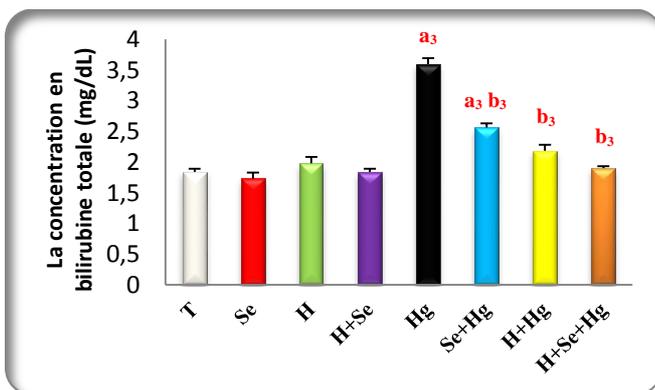
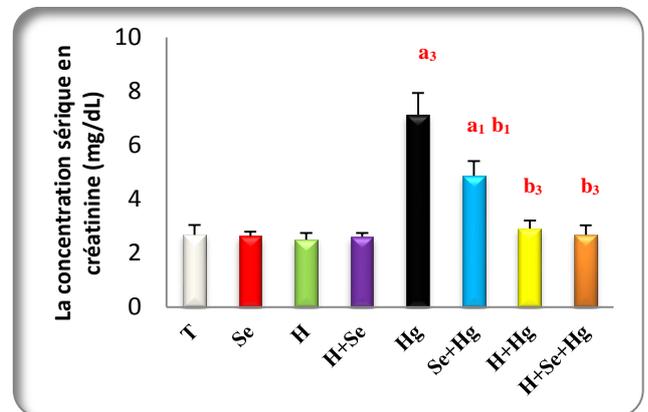
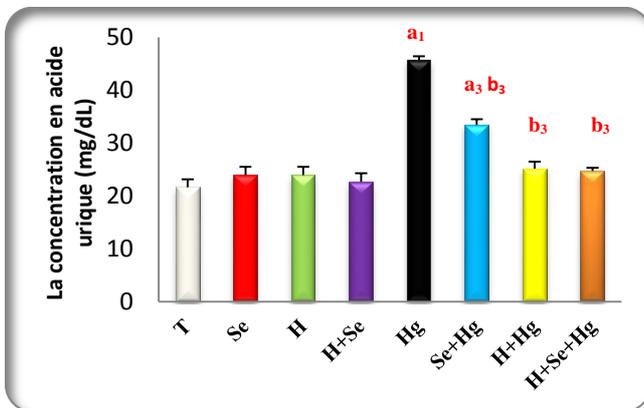
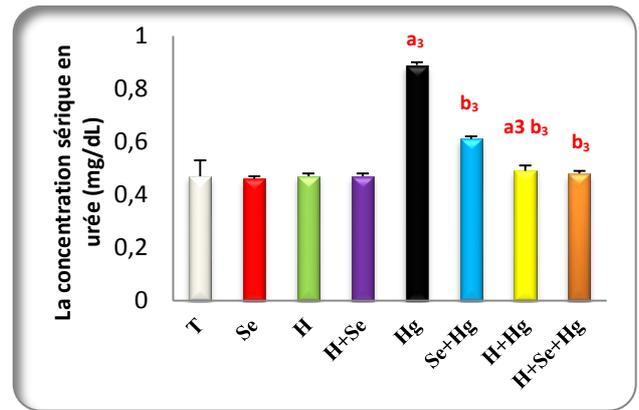
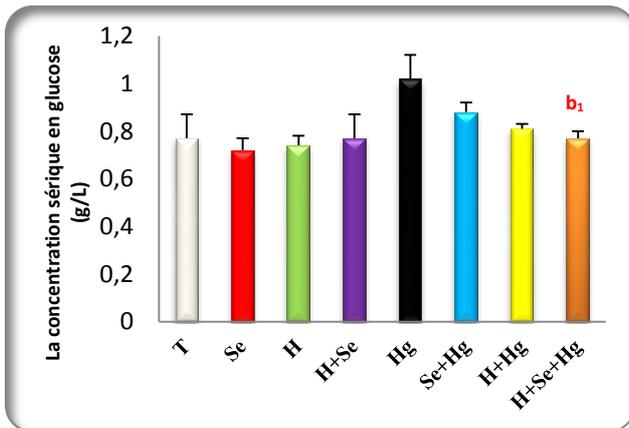
L'évolution de la créatinine sérique fait apparaître une augmentation très hautement significative, significative et non significative chez les lots traités par Se/Hg, H/Hg et H+Se/Hg respectivement par rapport le lot témoin. Par contre, on constate une diminution très hautement significative (H/Hg, H+Se/Hg) et significative (Se/Hg) par rapport le lot traités par le mercure seul.

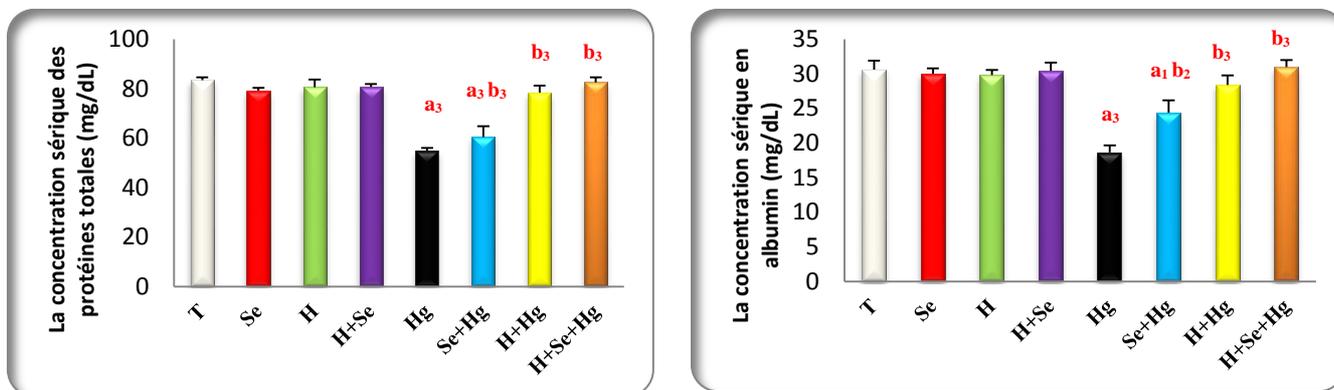
Nos résultats montrent que la concentration sérique de la bilirubine totale a augmenté de façon très hautement significative (Hg, H+Se/Hg) et non significative (Se/Hg, H/Hg) par rapport le lot témoin. En revanche on a enregistré une diminution très hautement significative chez les lots traités par la combinaison avec l'huile d'argan et le sélénium par rapport le mercure seul.

L'analyse de la concentration sérique de la bilirubine direct démontre l'existence d'une augmentation très hautement significative (Hg, Se/Hg), non significative (H/Hg, H+Se/Hg) par rapport le témoin. En revanche, on a enregistré une diminution très hautement significative chez les lots traités par H/Hg, Se/Hg et H+Se/Hg par rapport le lot traité par le mercure seul.

Les résultats obtenus révèlent une diminution très hautement significative (Hg, Se/Hg) et non significative (H/Hg, H+Se/Hg) de la concentration sérique des protéines totale et l'albumine par rapport le témoin. En revanche, l'administration de l'huile d'argan et du sélénium a

augmenté de sorte très hautement significative et non significative l'effet du mercure sur les protéines totales et l'albumine (Fig. 28, Annexe 08).





**Figure 28 :** Variation de la concentration sérique du glucose, urée, créatinine, acide urique, bilirubine totale , bilirubine direct, protéines totale et l’albumine chez le lot témoin et les lots traités par le Se, H, Se/H, Hg, Se/Hg, H/Hg et H +Se /Hg après 21 jours de traitement.

**a<sub>1</sub>** : Différence significative comparant au témoin ( $P \leq 0,05$ ).

**a<sub>2</sub>** : Différence hautement significative comparant au témoin ( $P \leq 0,01$ ).

**a<sub>3</sub>** : Différence très hautement significative comparant au témoin ( $P \leq 0,001$ ).

**b<sub>1</sub>** : Différence significative comparant au lot traité par chlorure de mercure ( $P \leq 0,05$ ).

**b<sub>2</sub>** : Différence hautement significative comparant au lot traité par le chlorure de mercure ( $P \leq 0,01$ ).

**b<sub>3</sub>** : Différence très hautement significative comparant au lot traité par le chlorure de mercure ( $P \leq 0,001$ ).

**P** : Seuil de signification.

### 2.2.2. Discussion

Dans nos conditions expérimentales, l'administration intrapéritonéale de 0.25mg/kg de poids corporel, du chlorure de mercure pendant 21 jours chez les rats *Wistar*, a perturbé les paramètres biochimiques, en effet, nous avons enregistré l'augmentation de la concentration sérique du glucose chez les rattes traitées au mercure par rapport aux témoins. Cette hyperglycémie est causée par la toxicité du mercure (Rao *et al.*, 2010) .qui agit par l'inhibition de la production de l'insuline par les îlots de Langerhans ou il bloque l'utilisation du glucose par les cellules et mène à la présence d'une concentration élevée d'insuline . En revanche, nos résultats révèlent une diminution de la glycémie chez les rattes traitées à la combinaison par rapport aux groupes traités par le mercure seul.

Le sélénium qui est supposé de diminuer la liaison de mercure aux biomolécules devrait prévenir les sources de sécrétion de l'insuline et protéger les enzymes et l'ATP impliquées dans le métabolisme du glucose, contre l'inactivation par le mercure. Barbagallo *et al* (2003) et Song *et al* (2004) ont signalé que l'élévation du sélénium améliore la sécrétion et l'action de l'insuline.

Le traitement des rats par l'huile d'argan induit une diminution de la glycémie par rapport aux rats traités par le mercure, l'activité hypoglycémiant de l'huile d'argan est probablement due à sa propriété antioxydante intracellulaire qui assure le bon fonctionnement de la machinerie enzymatique intracellulaire responsable du captage du glucose extracellulaire et son stockage sous forme de glycogène ou son conversion en acides gras au niveau hépatique. D'autre mécanisme hypoglycémiant sont aussi possible pour l'action de l'huile d'argan mettant en jeu le rôle de ses composés phénoliques notamment les Polyphénols. Selon Sarkhail *et al* (2007), les flavonoides influencent les cellules b pancréatiques et stimulent la sécrétion de l'insuline, alors que (Shimizu *et al.*, 2000) ont noté que les flavonoides exercent leur effet hypoglycemiant à travers le foie en influençant la gluconéogénèse, la glycogénogénèse et la glycogénolyse. Une étude récente de Bellahcen *et al* (2012) indique que l'administration de l'huile d'argan vierge à des rats n'a aucun effet sur le niveau de la glycémie à jeun. Néanmoins, dans un modèle de diabète induit par l'administration d'Alloxane, les résultats décrivent une diminution du taux de glucose dans le sang, une augmentation du glycogène hépatique et la prévention de la perte de poids chez les rats diabétiques prétraités avec huile d'argan (2 ml / kg) pour 7 jours avant l'induction d'un diabète de type 1.

Nous avons remarqué l'augmentation de la concentration sérique de la créatinine, de l'urée et de l'acide urique chez les rats traités au mercure par rapport aux témoins (Joshi *et al.*, 2010). L'augmentation des taux sériques en de l'urée et de la créatinine chez les rats contaminés au mercure est considérée comme un biomarqueur de la dysfonction rénale et les dommages rénaux provoqué par ce métal (Peixoto *et al.*, 2007 ; Ekor *et al.*, 2010). Urée et la créatinine ce sont des paramètres essentiels pour évaluer la fonction rénale et la filtration glomérulaire (Cempel et Janicka, 2002).

De plus, L'augmentation de la concentration sériques de l'acide urique dans notre étude peut expliquer par la dégradation intense du matériel génétique (ADN et ARN) (Liao and Freedman, 1998; Waisberg *et al.*, 2003) .Autrement, le taux élevé de l'acide urique circulant, peut être un indicateur de défense de l'organisme contre les effets délétères des radicaux libres, dont il augmente la production des antioxydants endogènes parmi lesquels l'acide urique qui prévient les modifications oxydatives des enzymes endothéliales et préserve la capacité de l'endothélium à méditer des dilatations vasculaires pour faire face au stress oxydant (Becker *et al.*, 1993).

Toutefois chez les rats traités au mercure associé au sélénium on note une diminution de la concentration d'urée, créatinine et l'acide urique, ceci est la cause de l'effet du sélénium qui protège le rein contre l'effet néfaste de mercure ou il augmente les processus de défense cellulaire vis-à-vis les effets cytotoxiques du stress oxydant induit par le mercure et réduise la production des radicaux libres (Deepmala *et al.*, 2013).

La diminution de la concentration plasmatique de urée, créatinine et acide urique après la supplimentation de l'huile d'argan avec le mercure peut être expliquer par l'amélioration du fonctionnement rénale. Une réduction de ces paramètres conduit à penser soit à l'amélioration des changements rénaux chez les rats traités par le mercure, soit à la diminution du catabolisme des paramètres rénaux par le biais des flavonoïdes.

De plus, l'augmentation de la concentration de la bilirubine est logique vue à la présence d'une lésion hépatique. Par ailleurs, le taux sanguin d'albumine, le principal transporteur de la bilirubine, baisse lors de certaines maladies du foie ou des reins témoigne de la présence d'une grande quantité de la bilirubine libre dans le sang. Rana et al., (1996) ont montré que l'élévation sérique de la bilirubine totale est un indicateur important des maladies et induit une hyperbilirubinémie, et l'élévation de la bilirubine directe signale les maladies hépatiques. En revanche, les résultats obtenus montrent qu'il existe une amélioration des paramètres précédents chez les rats traités à l'huile d'argan et le sélénium.

Nous avons constaté aussi une réduction de la concentration des protéines dans le sérum et d'albumine chez les rats traités par le mercure comparativement au témoin (Rao *et al.*, 2010). Ceci est expliqué d'une part par la diminution de la synthèse des protéines, cette réduction on peut l'expliqué par le fait que la plupart des protéines possèdent des groupements (SH, OH), ces dernières réagissent très facilement avec le mercure et les radicaux libres générés par ce métalloïde et par conséquence ces protéines peuvent se dénaturer et se fragmenter, ou perdre leurs structure primaires et secondaires (Joshi *et al.*, 2011).

Par ailleurs, l'administration du sélénium au lot traités au mercure, aide à élever le contenu des protéines, il l'apport aux limites normales, cette propriété du sélénium pourrait être attribuée a son rôle dans la synthèse de métallothionéine (Agarwal *et al.*, 2010).et régler de cette façon les précurseurs de l'acide aminé pour la synthèse des protéines.

L'huile d'argan à augmenté significativement le taux des protéines totales et l'albumine par apport aux rats traités par le mercure. Cet effet peut entre du à l'activité hypoglycémiant ou à la régulation de l'homéostasie du glucose et son utilisation par les tissus périphérique. L'existence des flavonoïdes dans l'huile d'argan peuvent semble être un facteur contribuant à l'amélioration de ces paramètres.

## 2.3. Influence du traitement sur les variations des paramètres lipidiques sérique

### 2.3.1. Résultats

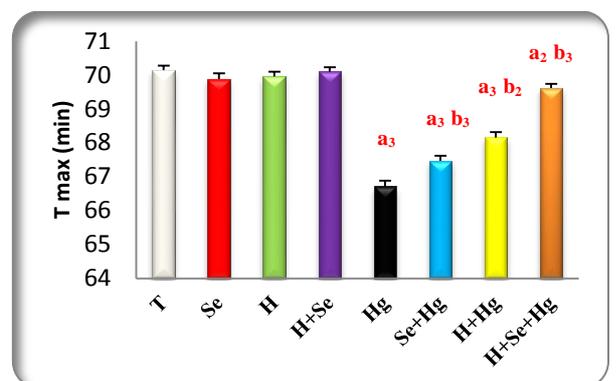
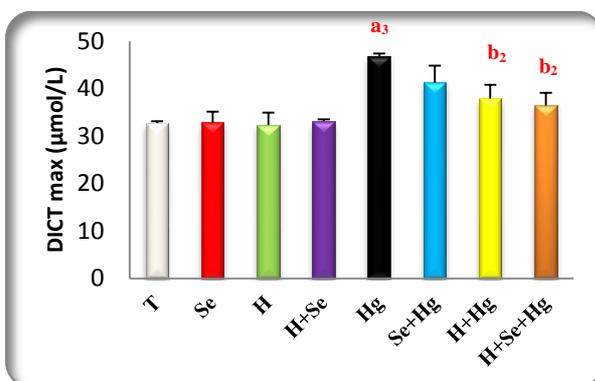
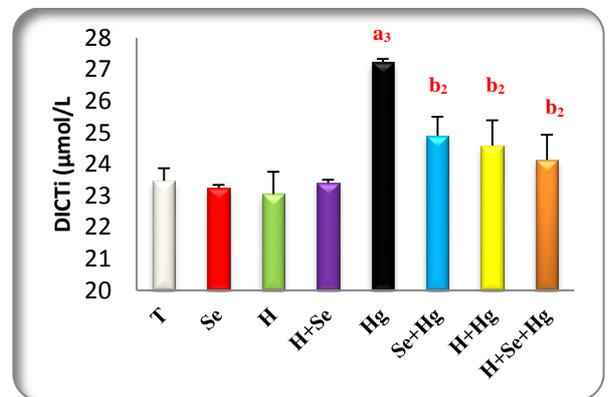
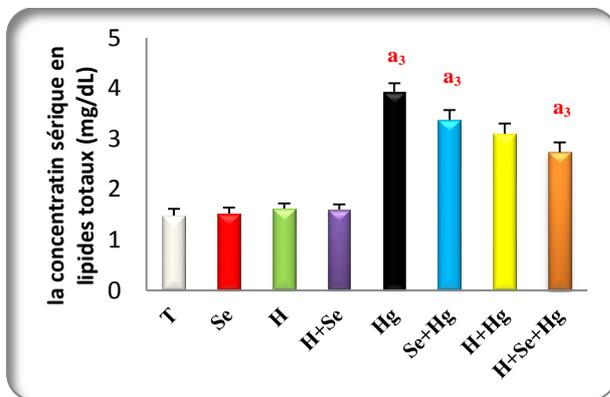
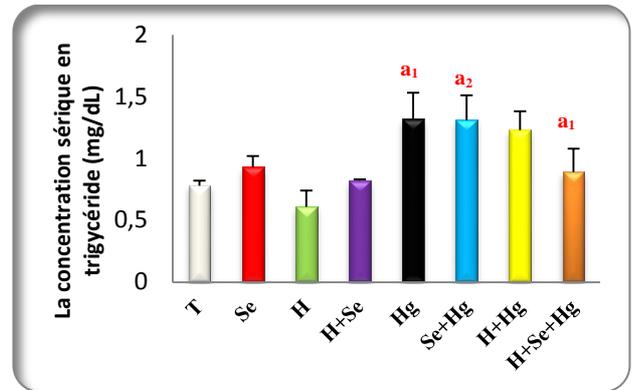
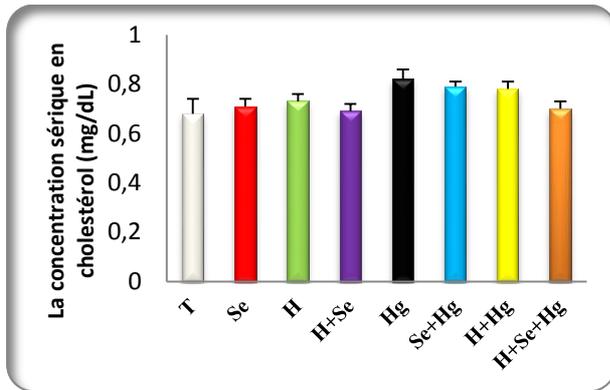
Les résultats obtenus montrent qu'il existe une variation significative de la concentration sérique des triglycérides chez tout les lots de traitement par rapport le témoin et non significative par rapport le lot traité par le mercure. Cependant, nous enregistrons une augmentation statistiquement non significative chez les lots de traitement par rapport le témoin ou le mercure seul.

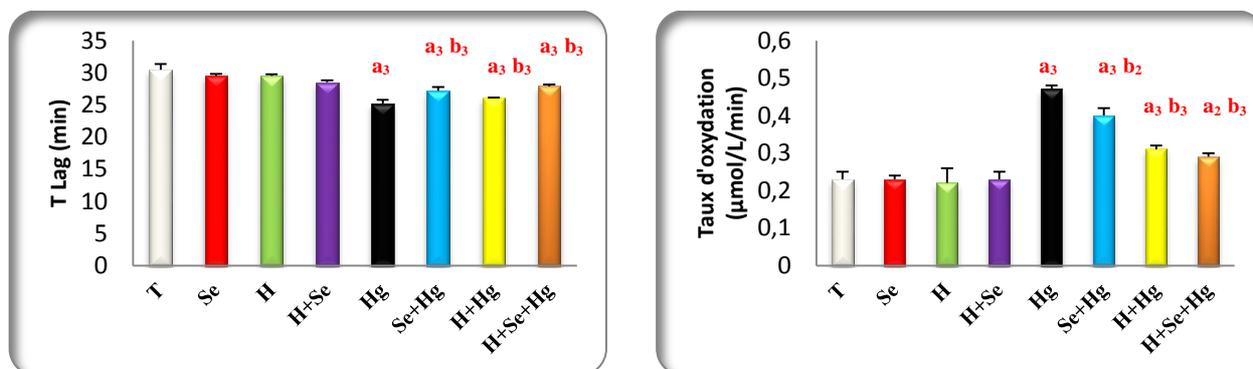
Autre part, la concentration sérique des lipides totaux présente une augmentation très hautement significative chez les lots traités par le mercure, Se/Hg, H/Hg et H+Se/Hg par rapport le témoin. En revanche, on constate une diminution non significative chez tous les lots de traitement par rapport le lot traité par le mercure seul.

Les résultats illustres dans (fig.29, annexe 09) révèlent l'existence d'une diminution très hautement significative dans le T (lag) chez tout les lots de traitement par rapport le témoin et une augmentation très hautement significative par rapport le lot traité par le mercure seul. Cependant, nous enregistrons une diminution très hautement significative dans le T max chez les lots traités par le mercure, H/Hg, Se/Hg et H+Se/Hg par rapport le lot témoin. En revanche, on constate une augmentation très hautement significative (H/Hg, H+Se/Hg) et hautement significative (Se/Hg) par rapport le lot traité par le mercure seul.

Autre part, le DI et le D max présente une augmentation statistiquement très hautement significative chez le lot traité par le mercure seul et non significative chez les lots traités par H/Hg, Se/Hg et H+Se/Hg par rapport le témoin. En revanche, on constate une diminution significative chez les lots traités par H/Hg, Se/Hg et H+Se/Hg par rapport le lot traité par le mercure seul.

De plus, le taux d'oxydation représente une augmentation très hautement significative chez tout le lot de traitement par rapport le lot témoin et une diminution très hautement significative par rapport le lot traité par le mercure seul.





**Figure 29 :** Variation de la concentration sérique de Cholestérol, Triglycérides, Lipides totaux, DICT I, DICTmax, T Lag, Tmax et taux d'oxydation chez le lot témoin et les lots traités par le Se, H, Se/H, Hg, Se/Hg, H/Hg et H +Se /Hg après 21 jours de traitement.

**a<sub>1</sub>** : Différence significative comparant au témoin ( $P \leq 0,05$ ).

**a<sub>2</sub>** : Différence hautement significative comparant au témoin ( $P \leq 0,01$ ).

**a<sub>3</sub>** : Différence très hautement significative comparant au témoin ( $P \leq 0,001$ ).

**b<sub>2</sub>** : Différence hautement significative comparant au lot traité par le chlorure de mercure ( $P \leq 0,01$ ).

**b<sub>3</sub>** : Différence très hautement significative comparant au lot traité par le chlorure de mercure ( $P \leq 0,001$ ).

**P** : seuil de signification

### 2.3.2. Discussion

Nous avons remarqué l'augmentation des concentrations sériques en cholestérol, triglycérides, les lipides totaux et les diène conjugué chez les lots traités au mercure par rapport aux témoins (Joshi *et al.*, 2010). Cette augmentation est due à la dégradation des tissus adipeux qui mène à la réduction du poids corporel à cause de la toxicité du mercure (Cempel et Janicka, 2002).

La peroxydation lipidique est un phénomène normalement contrôlé dans toutes les cellules de l'organisme et une grande variété de mécanismes antioxydants limite ce processus. En effet, les antioxydants agissent en formant des produits non radicalaires, d'autres en interrompant la réaction en chaîne de peroxydation, en réagissant rapidement avec un radical d'acide gras avant que celui-ci ne puisse réagir avec un nouvel acide gras, tandis que d'autres antioxydants absorbent d'autres produits d'oxydation comme des diènes conjugués et des aldéhydes qui à fortes concentrations, s'avèrent toxiques pour les cellules. La plupart de ces aldéhydes sont très réactifs et peuvent être considérés comme des seconds messagers toxiques qui augmentent les dommages initiaux dus aux radicaux libres (Esterbauer *et al.*, 1991), l'oxydation *in vitro* des lipoprotéines est aussi considérée comme un marqueur du statut oxydant / antioxydant. La mesure des diènes conjugués est utilisée comme indice de la peroxydation lipidique. Cette mesure est surtout intéressante pour l'évaluation précoce des peroxydations lipidiques (Hallivell et Gutteridge, 2007). Dans notre étude l'augmentation du taux de l'oxydation *in vitro* des lipoprotéines peut être expliquée par l'augmentation de la peroxydation lipidique sous l'action du mercure et ce par la production des radicaux libres qui agit sur les lipides plasmatique et membranaire (Hallivell et Gutteridge, 2007).

Chez les rats traités à la combinaison, les concentrations sériques des paramètres lipidiques sont réglées par l'addition du sélénium qui diminue l'activité des enzymes lipogéniques du foie par l'amélioration de l'action de l'insuline ou augmente l'activité de lipoprotéine lipase (Paolisso *et al.*, 1989; Rayssiguer *et al.*, 1991).

Le traitement des rats par l'huile d'argan à une dose de 5ml/kg provoque une diminution significative des profils lipidiques, cet effet est expliqué probablement par l'influence de l'huile d'argan sur les enzymes impliquées dans l'anabolisme des lipides d'une part et l'activation des enzymes impliqués dans le stockage des graisses au niveau des adipocytes sous forme de lipides simples. De nombreuses études ont démontré que le remplacement des AG saturés

dans l'alimentation par des AGPI peut réduire les taux de cholestérol total et du LDL (Atikah *et al.*, 2009). Il a été démontré qu'après 7 semaines de consommation d'huile d'argan, les TG, cholestérol et les lipides totaux étaient significativement réduits en raison de la présence d'AGPI (Drissi *et al.*, 2004). Une réduction significative a été également observée après la consommation d'huile d'argan pendant 4 semaines chez les rats obèses (Adlouni *et al.*, 2009). Berrada *et al.* (2000) et Berrougui *et al.* (2006) ont confirmé une amélioration du profil lipidique chez des rats dyslipidémiques, induite par un traitement chronique avec l'huile d'argan. Plusieurs études se sont intéressées aux propriétés anti-oxydantes de l'huile d'argan, ils peuvent être expliqués par le fait que les particules des LDL sont enrichies avec les différentes molécules anti-oxydantes de l'huile d'argan ce qui réduit leur susceptibilité à la peroxydation lipidique (Derouiche *et al.*, 2005 ; Sour *et al.*, 2012). Drissi *et al.* (2004) ont montré que les stérols, les tocophérols et les phénols contenus dans l'huile d'argan permettent d'augmenter la résistance des LDL à l'oxydation chez les sujets sains. Cherki *et al.* (2005) ont démontré que la consommation de l'huile d'argan améliorait le statut antioxydant du plasma en diminuant significativement la formation des lipopéroxyde et les diéne conjugués.

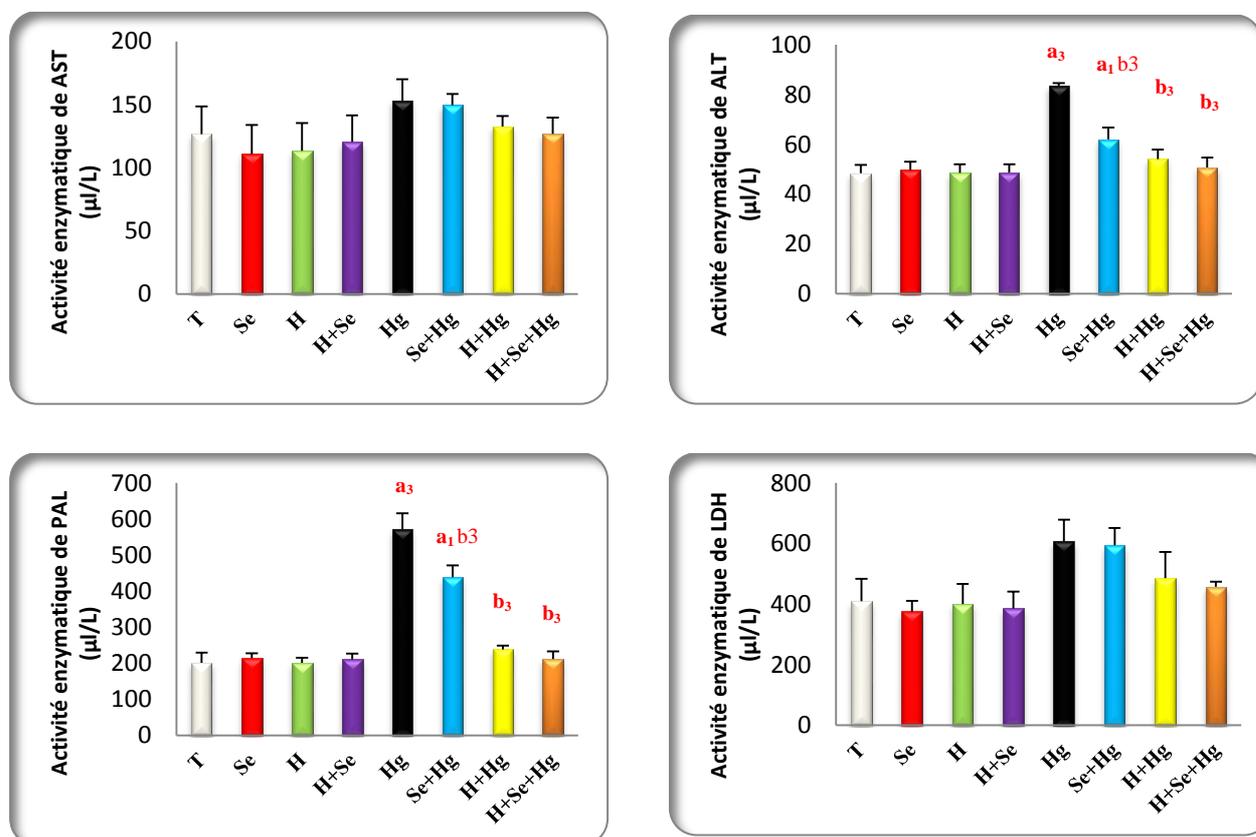
Des études récentes démontrent que l'incubation de LDL avec les l'extrait tocopherol, stérol et phénolique de l'huile d'argan augmente la lag-phase de la peroxydation lipidique. Ainsi, l'extrait phénolique de l'huile d'argan diminue la peroxydation lipidique et augmente la concentration plasmatique des vitamines (Cherki *et al.*, 2005).

## 2.4 .Influence du traitement sur les variations de l'activité sérique de quelque marqueur enzymatique

### 2.4.1. Résultats

Les résultats illustrés dans l'annexe 10 et la figure 30 , montrent une augmentation statistiquement non significative dans l'activité enzymatique de AST et LDH chez le lot traité par le mercure et les trois lots de combinaison par rapport au témoin. Aussi on note une diminution non significative chez les lots traités par H/Hg, Se/Hg et H+Se/Hg par rapport le lot traité par le mercure seul.

L'activité enzymatique de ALT et PAL a montré une élévation très hautement significative (Hg, Se/Hg) et non significative (H/Hg, H+Se/Hg) par rapport le lot témoin. On revanche, l'administration de l'huile d'argan et le sélénium, pourrait réduire d'une façon très hautement significative les niveaux de cette activité enzymatique par rapport le lot traité par le mercure seul.



**Figure 30 :** Variation de l'activité enzymatique de AST, ALT, PAL et LDH chez le lot témoin et les lots traités par le Se, H, Se/H, Hg, Se/Hg, H/Hg et H +Se /Hg après 21 jours de traitement.

**a<sub>1</sub>** : Différence significative comparant au témoin ( $P \leq 0,05$ ).

**a<sub>3</sub>** : Différence très hautement significative comparant au témoin ( $P \leq 0,001$ ).

**b<sub>3</sub>** : Différence très hautement significative comparant au lot traité par le chlorure de mercure ( $P \leq 0,001$ ).

**P** : seuil de signification

### 2.4.2. Discussion

Nos résultats ont montré une augmentation de l'activité des transaminases (AST et ALT) et PAL, LDH dans le sérum des rats traités au mercure. L'augmentation de ces enzymes indique une lésion hépatique et s'explique par la fuite des enzymes du tissu vers le plasma dû à l'altération de la perméabilité membranaire causé par le mercure, ces résultats sont en accord avec les travaux de Deepmala *et al* (2013).

L'administration de sélénium a atténué l'hépatotoxicité induit par le mercure, comme il est montré par les revenus des activités d'ASAT, ALAT, PAL et LDH à leurs niveaux normaux proches chez les rats témoins. L'effet précité indique clairement que le sélénium peut offrir la protection en se stabilisant la membrane cellulaire dans les désordres hépatiques induit par le mercure.

Le traitement par l'huile d'argan a améliorée l'activité des enzymes transaminases (AST, ALT, PAL et LDH) chez les rats traités au mercure, cette résultats peut être expliquer par la présence des antioxydants dans l'huile d'argan qui probablement stabiliser la membrane cellulaire hépatique et protéger les hépatocytes contre les effets toxiques de mercure qui peut diminuer la fuite des enzymes vers le plasma. Il a été noté que l'huile d'argan entraîne une diminution significative des taux plasmatique des paramètres hépatique et possède un effet préventif contre les dommages hépatique. Ces résultats en accord avec les travaux de Necib *et al* (2013a).

## 2.5. Influence du traitement sur les variations des paramètres hématologiques

### 2.5.1. Résultats

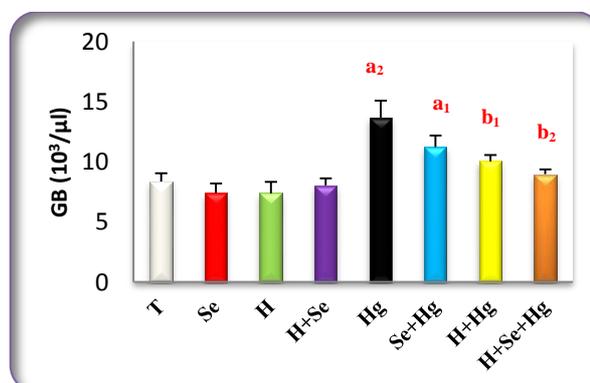
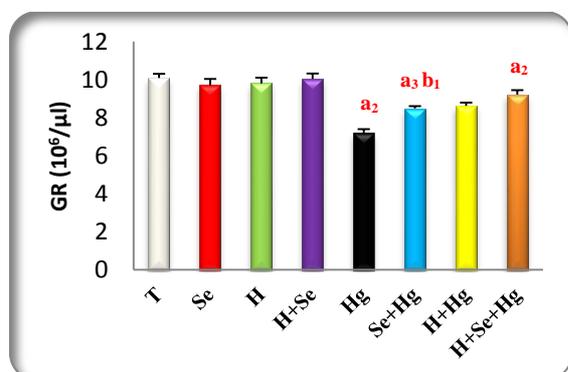
En ce qui concerne les paramètres hématologiques, nous constatons une augmentation hautement significative (Hg), significative (H/Hg) et non significative (Se/Hg, H+Se/Hg) des globules blancs par rapport le lot témoin. En revanche on constate une diminution dans les globules blancs, hautement significative et non significative chez les lots traités par (H+Se/Hg) et (Se/Hg, H/Hg) respectivement par rapport le lot traité par le mercure seul.

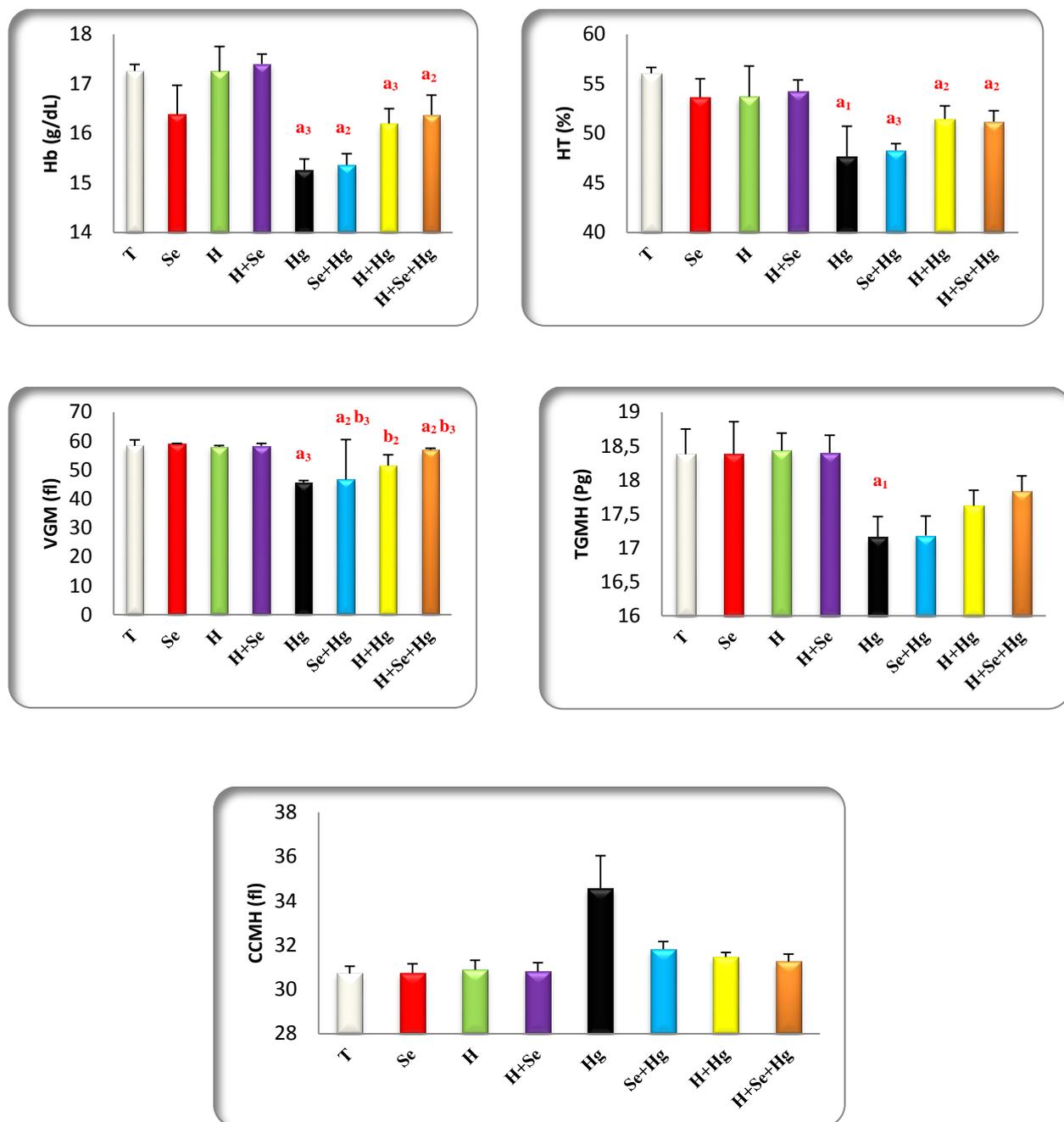
L'analyse du taux de globules rouges révèle l'existence d'une diminution hautement significative (Hg), significative (H/Hg, Se/Hg) et non significative (H+Se/Hg) par rapport le témoin. En revanche on constate une augmentation significative, hautement significative et non significative chez les lots traités par le mercure seul.

Notons aussi une diminution significative de pourcentage de l'hématocrite (Ht) et (Hb) chez tous lots traités en comparaison avec le témoin et cette diminution non significative par rapport le lot traité par le mercure seul.

L'analyse du taux de volume globulaire moyen (VGM), révèle l'existence d'une diminution très hautement significative (Hg, Se/Hg), hautement significative (H+Se/Hg) et non significative (H/Hg) par rapport le lot témoin. En revanche, on constate une augmentation très hautement significative et significative chez les lots traités par (Se/Hg, H+Se/Hg) et (H/Hg) respectivement par rapport le lot traité par le mercure seul.

De plus, la concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine montre une augmentation significative et non significative chez les lots traités par (Hg, Se/Hg) et (H/Hg, H+Se/Hg) respectivement par rapport le témoin. En revanche, on a enregistré une diminution non significative chez tous les groupes de traitement par rapport le mercure. Autre part, on constate une diminution statistiquement non significative du taux de la teneur globulaire moyen hémoglobine (TGMH) chez les lots traités par rapport au témoin ou par rapport au lot traité au mercure (fig. 31, annexe 11).





**Figure 31** : Variation de nombre des globule blancs (GB), des globule rouge (GR), du taux moyens d'hémoglobine (Hb), du pourcentage d'hématocrite (HT), de taux moyens du volume globulaire (VGM), la concentration corpusculaire moyen en hémoglobine (CCMH), la teneur globulaire moyen en hémoglobine (TGMH) chez le lot témoin et les lots traités par le Se, H, Se/H, Hg, Se/Hg, H/Hg et H +Se /Hg après 21 jours de traitement.

**a<sub>1</sub>** : Différence significative comparant au témoin ( $P \leq 0,05$ ).

**a<sub>2</sub>** : Différence hautement significative comparant au témoin ( $P \leq 0,01$ ).

**a<sub>3</sub>** : Différence très hautement significative comparant au témoin ( $P \leq 0,001$ ).

**b<sub>1</sub>** : Différence significative comparant au lot traité par chlorure de mercure ( $P \leq 0,05$ ).

**b<sub>2</sub>** : Différence hautement significative comparant au lot traité par le chlorure de mercure ( $P \leq 0,01$ ).

**b<sub>3</sub>** : Différence très hautement significative comparant au lot traité par le chlorure de mercure ( $P \leq 0,001$ ).

**P** : seuil de signification.

### 2.5.2. Discussion

Comme il a été observé précédemment, la présence de mercure induit l'apparition d'espèces réactives de l'oxygène. Parmi les mécanismes possibles est proposée l'interaction du mercure avec le fer potentialisant l'apparition de ROS suite à la présence de quantité de fer réactif trop importante dans la cellule (Puntarulo, 2005). Le mercure peut aussi engendrer des situations d'anémies plus ou moins importantes (Horiguchi *et al.*, 1996). Ainsi, il semble que la présence de mercure dans les cellules provoque un déséquilibre global en métaux essentiels comme le fer (Martelli *et al.*, 2006).

L'analyse de nos résultats a montré que la contamination des rats par le mercure a provoqué une diminution importante des globules rouges, d'hémoglobine et d'hématocrite. De plus, on note une diminution significative de VGM et aucune différence significative des ; CCMH, TGMH. D'après ces résultats on peut dire que le mercure a provoqué une anémie. Cette anémie est due d'une part ; aux effets des radicaux libres générés par le mercure sur les globules rouges, où certains radicaux libres comme  $O_2\cdot$  et  $OH$  sont des espèces très réactives capables de provoquer des dommages cellulaires par le biais de la peroxydation des lipides membranaires, de plus en présence de fortes concentrations de ces radicaux, l'hémoglobine peut facilement s'oxyder (Gurer *et al.*, 1998 ; Hughes, 2002 ; Modi *et al.*, 2006).

En revanche, on a enregistré une augmentation bien claire des globules blancs chez les rats traités au mercure par rapport aux témoins. Cette augmentation explique que l'animale mobilise toutes ces capacités de défense (notamment les leucocytes) pour lutter contre les infectieux causés par la présence des xénobiotiques dans son organisme (Karmakar *et al.*,

2000).Ce qui confirme l'importance des globules blancs dans la défense immunitaire contre les toxiques.

Cependant, cette anémie est corrigée chez le lot traité l'huile d'argan et le sélénium après 21 jours de traitement. L'huile d'argan entraine dans la régulation des paramètres hématologique. Ces résultats en accord avec les travaux de Mekhfi *et al* (2012) qui ont trouvé une régulation dans les paramètres hématologique chez les rats traités par l'huile d'argan à une dose de 10 ml/kg.

## 2.6. Influence du traitement sur les variations des paramètres immunologiques

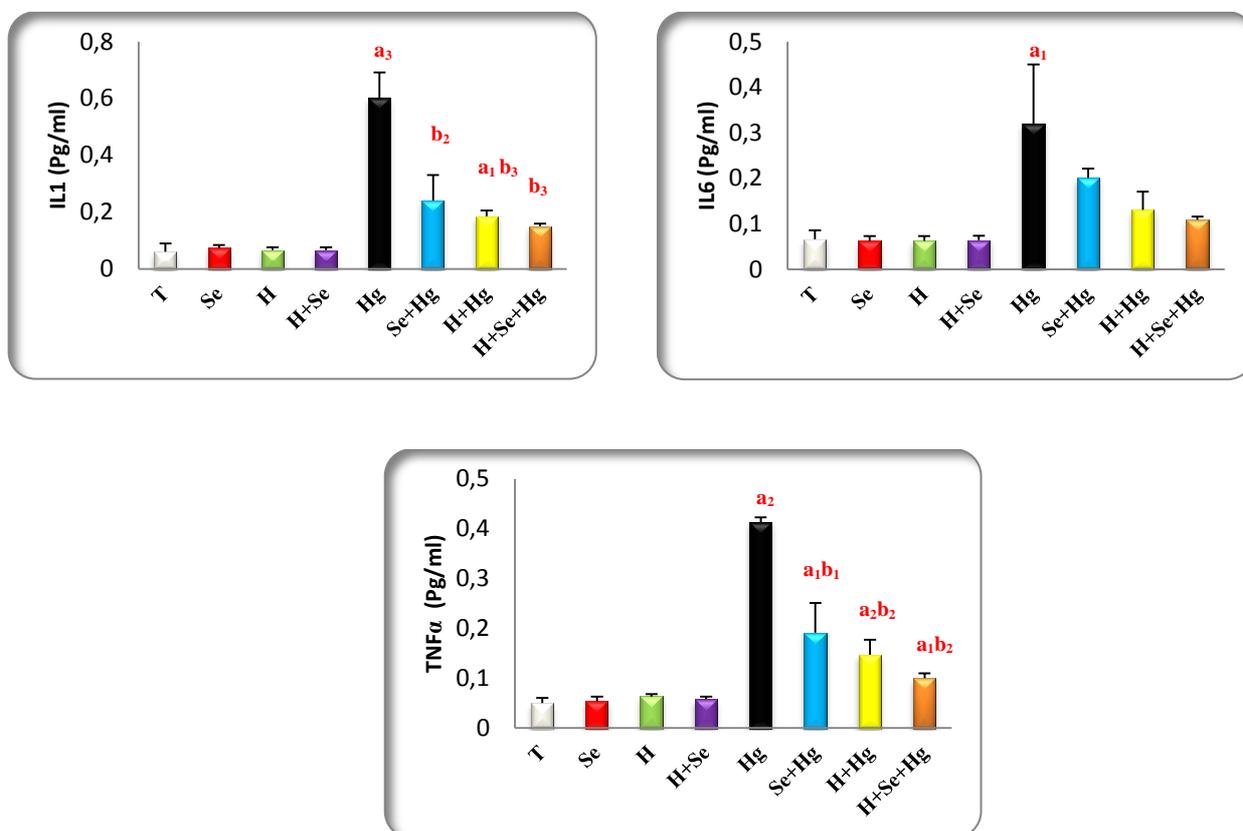
### 2.6.1. Résultats

Les résultats obtenus montrent qu'il existe une variation très hautement significative (Hg, H+Se/Hg), significative (H/Hg) et non significative (Se/Hg) de la concentration sérique en IL1 par rapport le témoin. En revanche on constate une diminution très hautement significative et significative chez les rats traités par (H/Hg, H+Se/Hg) et (Se/Hg) respectivement par rapport le mercure seul.

Cependant, nous enregistrons une augmentation statistiquement hautement significative (Se/Hg), significative (H/Hg) et non significative (Hg, H+Se/Hg) par rapport le lot témoin. Par contre, on constate une diminution non significative chez tous les groupes de traitement par rapport le lot traité par le mercure seul.

De plus, la concentration sérique de TNF présente une augmentation hautement significative (Hg, H/Hg) et significative (Se/Hg, H+Se/Hg) respectivement par rapport le témoin. En revanche, on constate une diminution hautement significative et significative chez les lots traités par (H/Hg, H+Se/Hg) et (Se/Hg) respectivement par rapport le lot traité par le mercure seul (fig. 32, annexe 12).

Les résultats illustrent dans la (fig. 33, annexe 12) démontrent une diminution non significative dans l'activité phagocytaire chez tout les lots de traitement en comparant au lot témoin et une augmentation non significative chez le lot traité par le mercure seul.



**Figure 32 :** Variation de la concentration sérique de IL1, IL6 et TNF $\alpha$  chez le lot témoin et les lots traités par le Se, H, Se/H, Hg, Se/Hg, H/Hg et H +Se /Hg après 21 jours de traitement.

**a<sub>1</sub>** : Différence significative comparant au témoin ( $P \leq 0,05$ ).

**a<sub>2</sub>** : Différence hautement significative comparant au témoin ( $P \leq 0,01$ ).

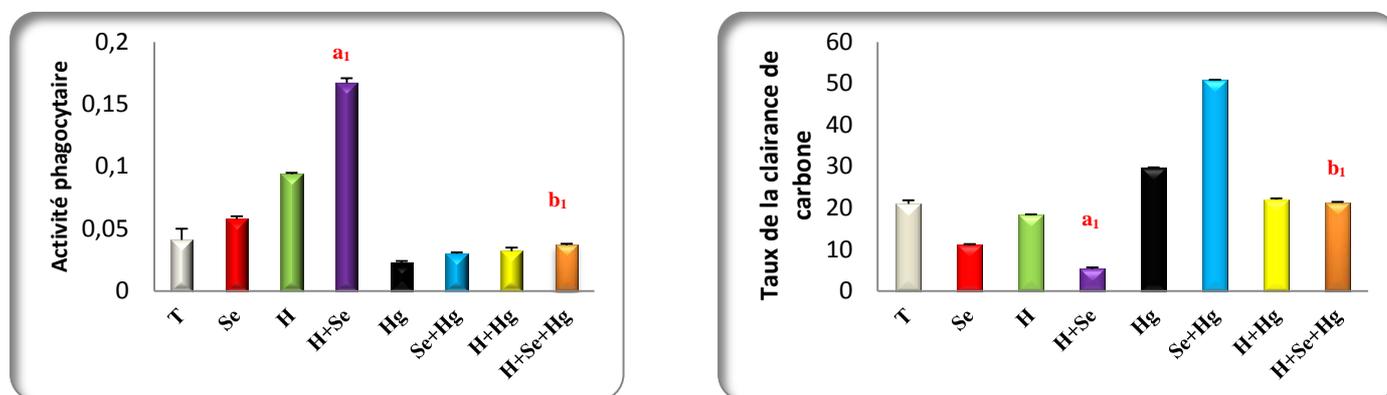
**a<sub>3</sub>** : Différence très hautement significative comparant au témoin ( $P \leq 0,001$ ).

**b<sub>1</sub>** : Différence significative comparant au lot traité par chlorure de mercure ( $P \leq 0,05$ ).

**b<sub>2</sub>** : Différence hautement significative comparant au lot traité par le chlorure de mercure ( $P \leq 0,01$ ).

**b<sub>3</sub>** : Différence très hautement significative comparant au lot traité par le chlorure de mercure ( $P \leq 0,001$ ).

**P** : seuil de signification.



**Figure 33** : Variation de l'activité phagocytaire et le taux de la clairance de carbone chez le lot témoin et les lots traités par le Se, H, Se/H, Hg, Se/Hg, H/Hg et H +Se /Hg après 48 heures de traitement.

**a<sub>1</sub>** : Différence significative comparant au témoin ( $P \leq 0.05$ )

**b<sub>1</sub>** : Différence significative comparant au lot traité par chlorure de mercure ( $P \leq 0,05$ ).

**P**: Seuil de signification.

### 2.6.2. Discussion

Nos résultats montrent que l'injection IP des rats par le mercure à une dose de 0.25 mg/kg, provoque une diminution dans l'activité phagocytaire après 48 heures de l'injection et une augmentation dans le profil des cytokines pro-inflammatoire après 21 jours de traitement.

La diminution dans l'activité phagocytaire peut être expliquée par l'effet immunosuppresseur de mercure. Ces résultats sont en accord avec les travaux de Necib *et al* (2013h) qui ont trouvé que l'injection IP de mercure à une dose 0.25 mg/kg chez la souris entraîne une diminution significative dans l'activité phagocytaire après 48 heures de l'injection.

L'augmentation de profil des cytokines pro-inflammatoire après 21 jours de traitement par le mercure, peut être expliquée par l'effet immunomodulateur de mercure, le mercure inhibe les médiateurs cellulaires du système immunitaire par l'effet mitogène spécifique aux cellules T lymphocytes, NK (les cellules cytotoxiques) (Alback *et al*, 1009) et stimule Th1 (les cellules responsables de la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires), toutes ces

perturbation conduit à l'apparition d'un déséquilibre dans la balance Th1/Th2 vers la production des cytokines pro-inflammatoire et provoque l'inflammation chronique donc la diminution dans la production des médiateur cellulaire de système immunitaire (Kim et al, 2002).

Le mercure à également un effet toxique sur l'efficacité de thymique, d'après les travaux précédents qui sont réalisé sur l'atrophie du cortex thymique chez la souris après l'exposition au mercure. Les mécanismes moléculaires par lesquels le mercure affecte à la fois du thymus et de l'efficacité immunitaire périphérique ne sont pas entièrement comprises. De plus, le mercure inhibe la synthèse protéique plus forte que la puromycine et cycloheximide. Le mercure peut aussi inhiber les protéines appartenant à la famille INF qui entraine dans la synthèse des médiateurs cellulaire. L'effet immunomodulateur du mercure se traduit par une immonosuppression par une inhibition de la prolifération lymphocytaire et augmente la production des cytokines pro-inflammatoire. De plus, pour certains auteurs, le mercure peut induire une augmentation des radicaux libres dans les lymphocytes provoquant un stress oxydatif intracellulaire (Kim *et al*, 2002), Les étude in vitro de santarelli *et al* (2006) dans la culture cellulaire de thymus exposé au mercure démontrent l'immunomodulateur de mercure par l'inhibition des prolifération des médiateurs cellulaires et l'activité de cellule NK ainsi que CD<sup>4+</sup> et CD<sup>+8</sup> d'une part et augment le profil de cytokines pro-inflammatoire d'autre part d'autre étude de Kim et al (2002) révèlent que l'exposition du mercure in vitro à une dose 20µM dans la culture cellulaire de macrophage inhibent l'oxyde nitrique qu'est un antioxydant contre le mercure et entraine dans l'activation des cytokines pro-inflammatoire ou la concentration deviennent plus élevée comparants aux témoin. Une autre étude in vivo de santarelli *et al* (2006) démontrent que l'administration des souris du mercure à une dose de 1mg/kg pendant 1 mois entraine dans l'inhibition de l'activité De thymuline, diminution de la production de NO et altération des médiateurs cellulaire NK, en revanche, il révèlent que ce traitement augmente le profile des cytokines pro-inflammatoire.

La supplémentation du sélénium aux rats traité par le mercure entraine une augmentation de l'activité phagocytaire et diminution dans le profil des cytokines pro-inflammatoire. Cette résultat peut être expliquer par la capacité du sélénium à réguler l'expression de récepteurs de différentes cytokines, l'interaction entre les interleukines et leurs récepteurs sur les lymphocytes est capitale pour permettre leur expansion clonale et leur différenciation, les résultats de l'activité phagocytaire dans la présente étude sont en accord avec l'étude de Beck et al (2005) qui ont montré que la phagocytose d'E.coli, chez les veaux de Boucherie augmente suite à la supplémentation des vaches en sélénium.

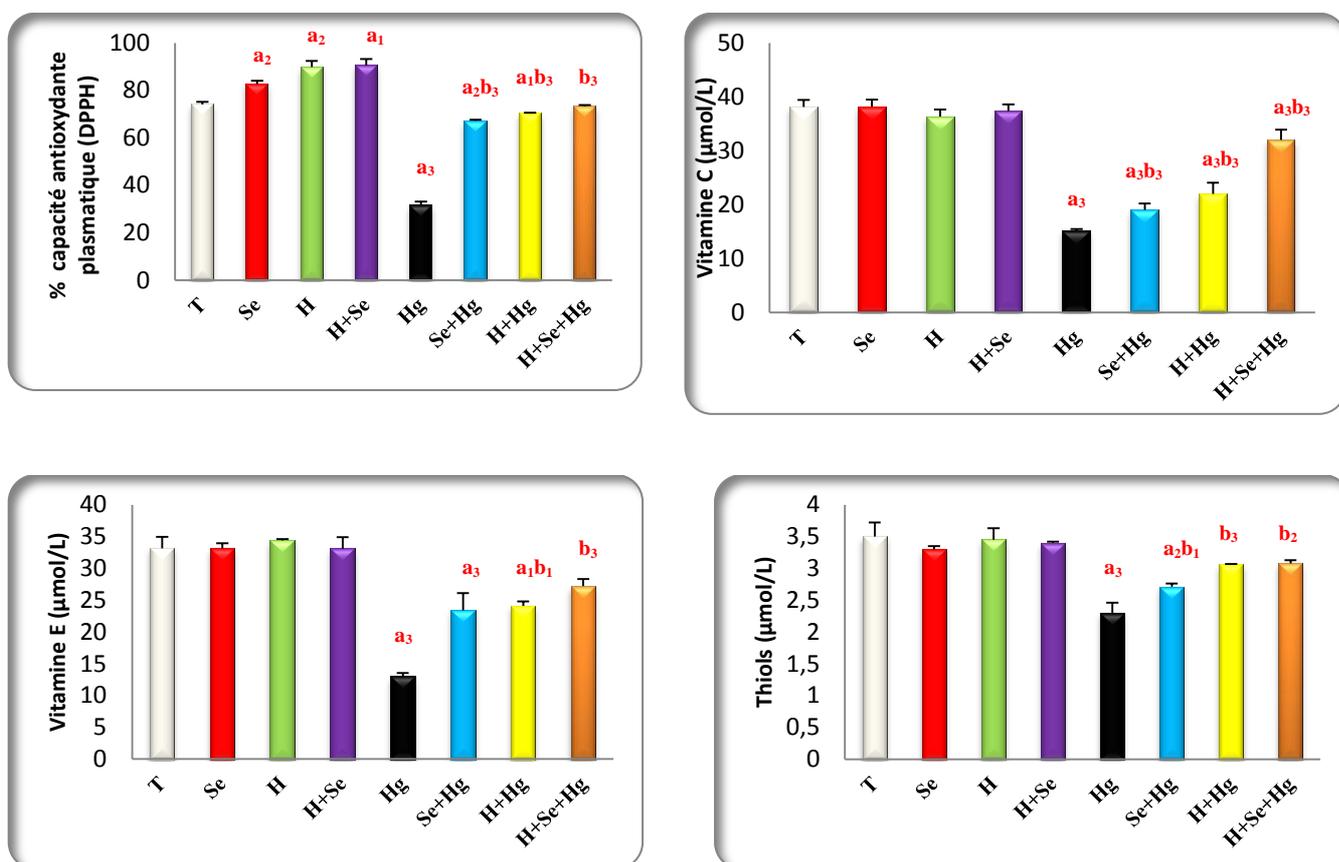
Des études récentes révèlent que l'huile d'argan possède un effet immunostimulant. Il stimule la prolifération lymphocytaire, l'activité phagocytaire et diminue la production des cytokines pro-inflammatoires. La diminution de la production des cytokines pro-inflammatoires peut être expliquée par l'action des composés de l'huile d'argan sur le système immunitaire, des études récentes démontrent que les saponines d'*Argania Spinosa* ont une action anti-inflammatoire à la dose 500 mg/kg per os in vivo, ce qui peut être expliqué par l'action des saponines sur le profil des cytokines pro-inflammatoires. Notre résultat est en accord avec les travaux de Necib *et al* (2013f) qui ont démontré que l'huile d'olive diminue le profil des cytokines pro-inflammatoires chez les rats traités par le mercure pendant 15 jours de traitement, ils expliquent cette diminution par la présence des composés antioxydants et anti-inflammatoires dans l'huile d'olive. Deux études récentes de Necib *et al* (2013d, h) démontrent que l'huile d'argan augmente l'activité phagocytaire chez les rats traités par les doses : 2.5ml/kg, 5ml/kg, 10ml/kg. La deuxième étude de même auteur révèle que l'administration de l'huile d'argan combinée avec le mercure, stimule l'activité phagocytaire chez la souris. Nos résultats sont en accord aussi avec les travaux récents Benzaria (2006) qui démontrent que l'effet de l'huile d'argan sur le système immunitaire est similaire que l'huile d'olive.

## **2.7. Influence du traitement sur la capacité antioxydante plasmatique**

### **2.7.1. Résultats**

Les résultats illustrent dans (fig. 34, annexe 13) présentent une diminution très hautement significative, hautement significative, significative et non significative de DPPH chez les lots traités par Hg, H/Hg, Se/Hg et H+Se/Hg respectivement par rapport au témoin. En revanche, on constate une augmentation très hautement significative chez tous les lots de traitement par rapport au lot traité par le mercure seul.

L'analyse de la concentration sérique des vitamines E et C révèle l'existence d'une diminution très hautement significative chez tous les lots de traitement par rapport au lot témoin et une augmentation très hautement significative chez le lot traité par le mercure seul. En ce qui concerne la concentration de SH plasmatique, une diminution très hautement significative et non significative chez les lots traités par (Hg, Se/Hg) et (H/Hg, H+Se/Hg) respectivement par rapport au lot témoin. En revanche, on constate une augmentation très hautement significative et significative chez les lots traités par (H/Hg, H+Se/Hg) et (Se/Hg) respectivement par rapport au lot traité par le mercure seul.



**Figure 34 :** Variation de la capacité anti-oxydante plasmatique vis-à-vis DPPH, la concentration plasmatique des vitamines C, E et des thiols chez le lot témoin et les lots traités par le Se, H, Se/H, Hg, Se/Hg, H/Hg et H +Se /Hg après 21 jours de traitement.

**a<sub>1</sub>** : Différence significative comparant au témoin ( $P \leq 0,05$ ).

**a<sub>2</sub>** : Différence hautement significative comparant au témoin ( $P \leq 0,01$ ).

**a<sub>3</sub>** : Différence très hautement significative comparant au témoin ( $P \leq 0,001$ ).

**b<sub>1</sub>** : Différence significative comparant au lot traité par chlorure de mercure ( $P \leq 0,05$ ).

**b<sub>2</sub>** : Différence hautement significative comparant au lot traité par le chlorure de mercure ( $P \leq 0,01$ ).

**b<sub>3</sub>** : Différence très hautement significative comparant au lot traité par le chlorure de mercure ( $P \leq 0,001$ ).

**P** : seuil de signification.

### 2.7.2. Discussion

Les résultats obtenus montrent que la capacité du plasma à absorber les radicaux libres, représentant le pouvoir antioxydant total (DPPH) est significativement abaissée chez les rats traités par le mercure comparées aux rats témoins. Le DPPH est un test qui consiste à évaluer la capacité que possède le plasma à inhiber la production d'espèces oxygénées réactives générées par un système *in vitro*. Le plasma renferme de nombreuses substances antioxydantes dont certaines sont connues (glutathion réduit, protéines à groupements thiols, acide urique, bilirubine.....), alors que d'autres ne sont pas clairement identifiées (Halliwell et Gutteridge, 2007). Plusieurs méthodes ont été développées pour mesurer le pouvoir antioxydant total du plasma du à l'ensemble de ces substances (Prior et CAO, 1999). La réduction de celui-ci est associée à une profusion des hydroperoxydes plasmatiques chez les rats traités par le mercure, marquant l'existence d'un stress oxydatif évident. La diminution de la concentration des SH protéique peut être expliquée par l'oxydation des protéines, les protéines peuvent subir des réactions radicalaires ou oxydantes, celles comportant des groupements sulfhydriles étant les plus sensibles aux attaques radicalaires. C'est le cas de nombreuses enzymes cellulaires et protéines de transport, qui après oxydation, deviennent inactives et beaucoup plus sensibles à l'action des protéases (Favier, 2003). Dans notre étude, les teneurs plasmatique en vitamines antioxydantes Cet E sont significativement abaissées chez les rats traités par le mercure comparant aux témoin. Ceci peut s'expliquer par une défaillance du système de défense antioxydant ou une élévation de la production des radicaux libres chez les rats traités par le mercure. la vitamine E représente l'activité vitaminique la plus élevée, il agit en piégeant les radicaux libres formés notamment à partir des AGPI, en inhibant la propagation des réactions en chaîne à la fois au niveau membranaire et lipoprotéine. En plus de son rôle antioxydant (inhibe l'oxydation des LDL). plusieurs études ont montré, chez le rat traité par le mercure une diminution des teneurs en acide ascorbique dans le plasma, le foie et les reins. Cette baisse de vitamine C peut être due à une excrétion urinaire élevée d'acide ascorbique (yue et al, 1990). Par ailleurs, le rôle de l'acide ascorbique est similaire à celui de GSH puisqu'il est aussi un piègeur des radicaux libres, et l'utilisation amplifiée de cette vitamine fait suite au stress oxydatif présent dans les rats traités par le mercure. L'acide ascorbique est aussi utilisé dans la régénération de la vitamine E (lee and dabrowski, 2003).

Lorsqu'on exam le statut total antioxydant en déterminant l'activité de DPPH et les vitamines dans le plasma on note à nouveau que les animaux traités par le mercure démontre une baisse des ces indicateurs et le sélénium semble normaliser leurs concentrations.

L'huile d'argan est aussi caractérisée par sa richesse en antioxydants tels que les stérols et les polyphénols et particulièrement des tocophérols (Khallouki *et al*, 2003). cherki *et al* (2005) ont démontré que la consommation de l'huile d'argan améliorerait le statut antioxydant du plasma en augmente significativement le DPPH et la concentration plasmatique de la vitamines E et C. En tenant des résultats obtenus, il paraît que l'augmentation de la capacité anti-oxydante plasmatique, est probablement attribuée à une élévation du taux d'antioxydants exogènes tels que l'acide ascorbique, les vitamines ou les composés phénoliques acquis suite au traitement par l'huile d'argan dont les propriétés anti-oxydantes ou été déjà démontrées dans notre étude in vitro.

## **2.8. Influence du traitement sur les variations des paramètres du stress oxydant**

### **2.8. Résultats**

Nos résultats (fig. 35, annexe 14) révèlent que la concentration du GSH érythrocytaire diminué de façon très hautement significative chez les rats traité par Hg, H/Hg, Se/Hg et H+Se/Hg par rapport le témoin. En revanche, on constate une augmentation non significative chez tous les lots de traitement par rapport le lot traité par le mercure seul.

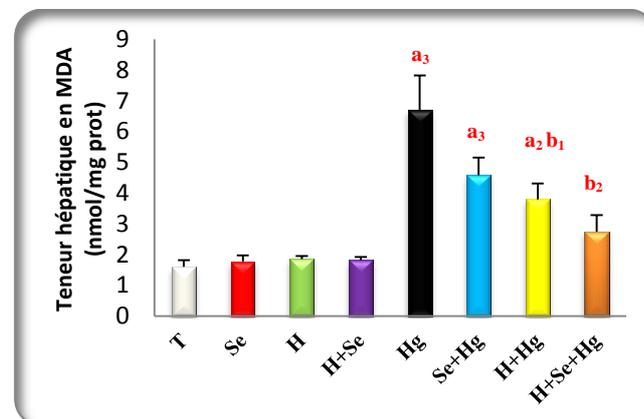
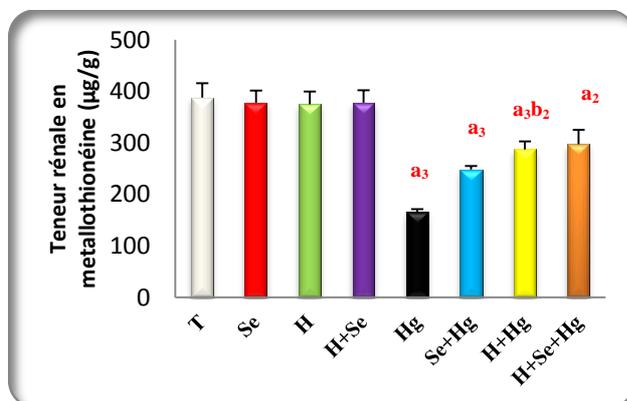
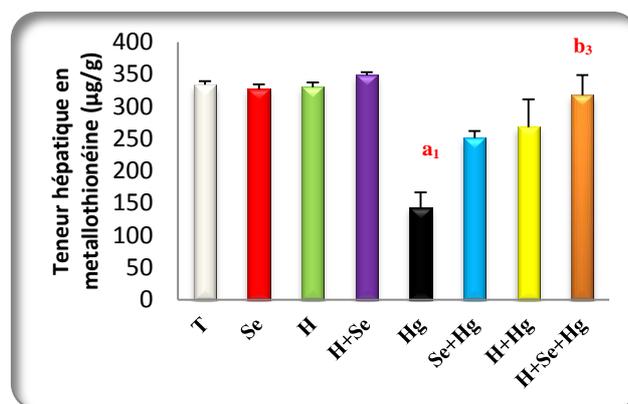
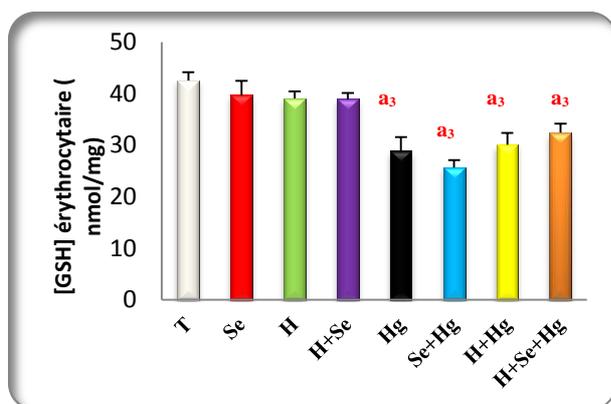
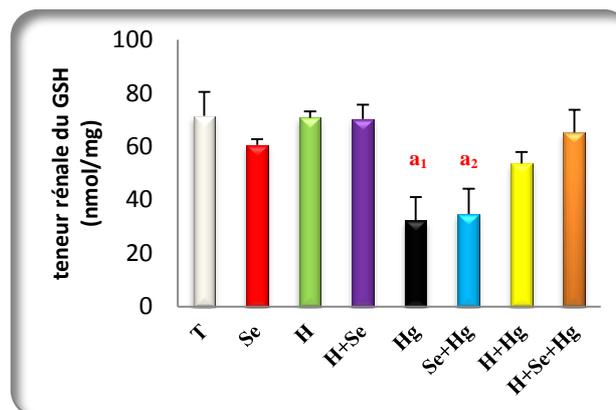
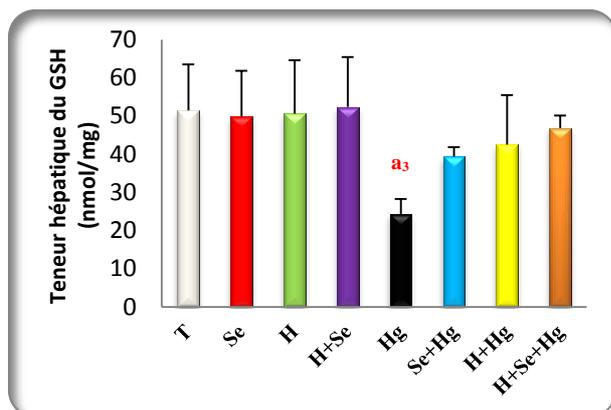
Notons aussi, une diminution non significative de la concentration hépatique et rénale du GSH chez tout les lots de traitement par rapport le témoin, et une augmentation non significative chez tout le lot de traitement par rapport le lot traité par le mercure seul.

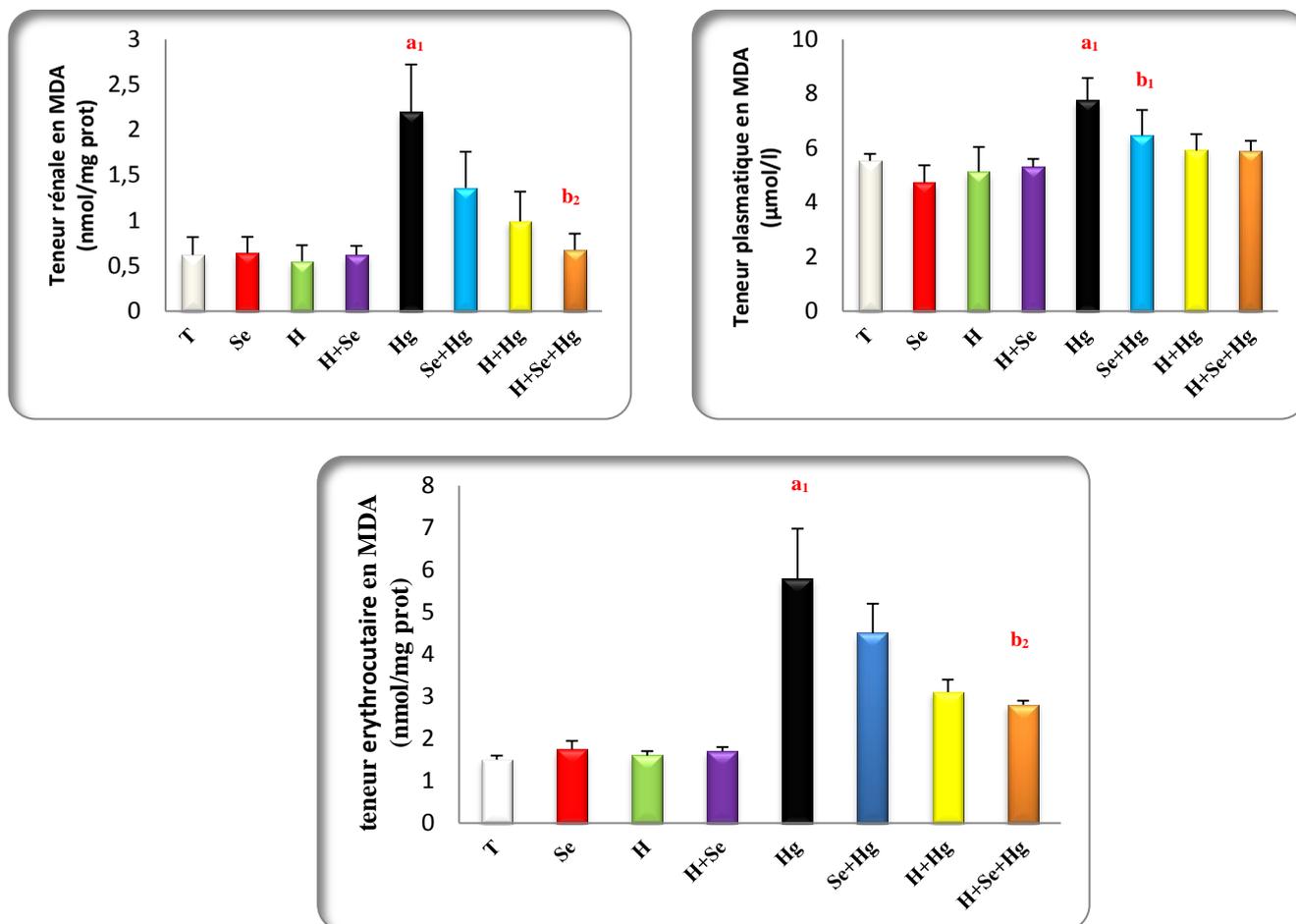
De plus, on observe une diminution significative dans la concentration des MT hépatique et rénale par rapport le témoin. Par contre, on note une augmentation significative dans cette concentration comparant au lot traité par le mercure seul.

D'autre part, nous enregistrons une augmentation hautement significative de la concentration plasmatique, érythrocytaire, hépatique et rénale de MDA chez les lots traités par rapport le témoin. En revanche, on constate une diminution significative de cette concentration en comparant au lot traité par le mercure seul.

Cependant, on note une diminution très hautement significative de l'activité enzymatique du GPx érythrocytaire, hépatique et rénale chez les lots de traitement par rapport le témoin. En revanche, on note une augmentation significative de cette activité en comparant au lot traité par le mercure seul.

De plus, on note une diminution très hautement significative dans l'activité enzymatique de GST, catalase et SOD hépatique et rénale par rapport le témoin. Par contre, on note une augmentation hautement significative dans cette activité comparant au lot traité par le mercure seul (fig. 36, annexe 15, 16).





**Figure 35** : variation de taux de GSH hépatique, rénale et érythrocytaire, metallothionéine hépatique et rénale et MDA hépatique, rénale, érythrocytaire et plasmatique chez le lot témoin et les lots traités par le Se, H, Se/H, Hg, Se/Hg, H/Hg et H +Se /Hg après 21 jours de traitement.

**a<sub>1</sub>** : Différence significative comparant au témoin ( $P \leq 0,05$ ).

**a<sub>2</sub>** : Différence hautement significative comparant au témoin ( $P \leq 0,01$ ).

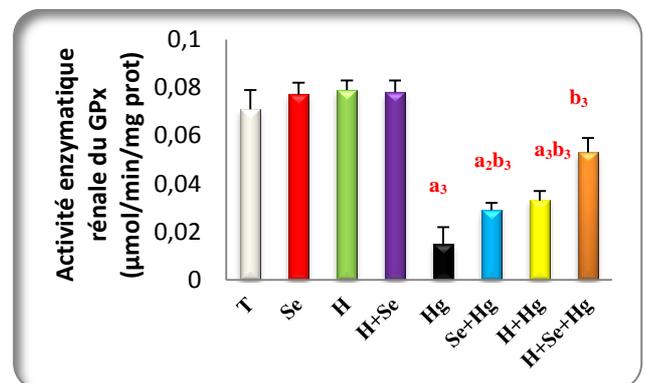
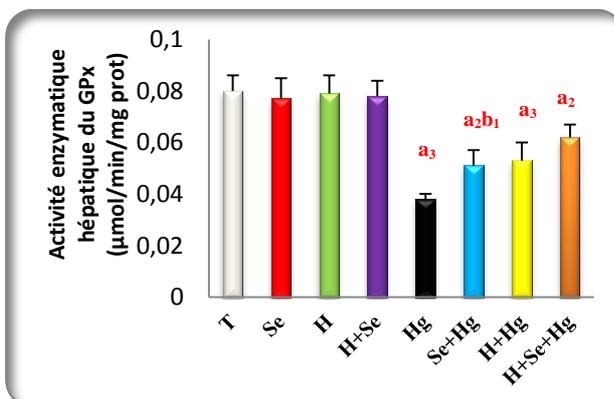
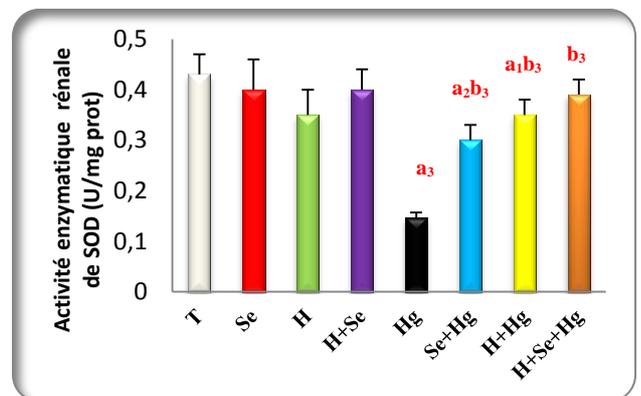
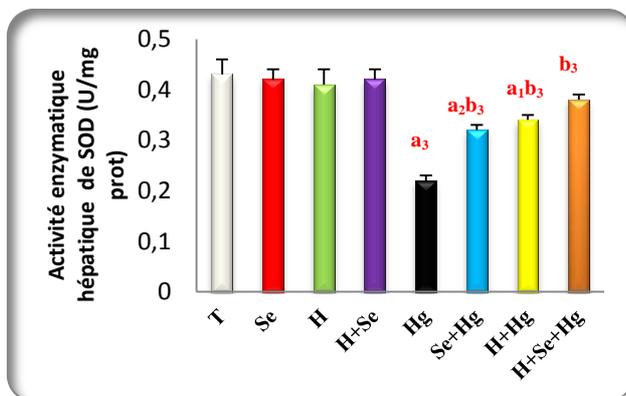
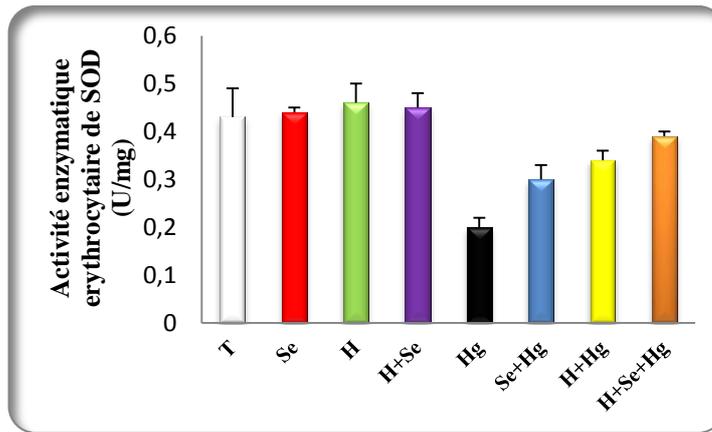
**a<sub>3</sub>** : Différence très hautement significative comparant au témoin ( $P \leq 0,001$ ).

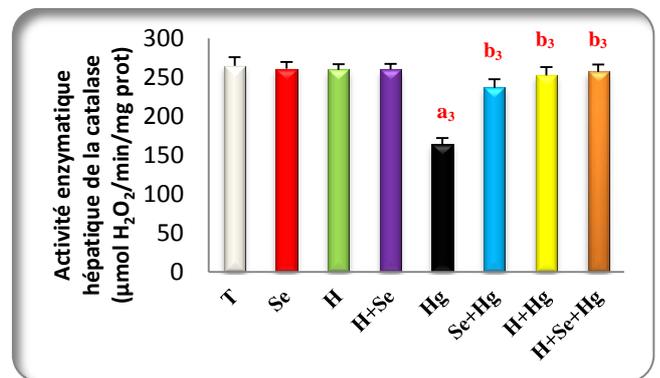
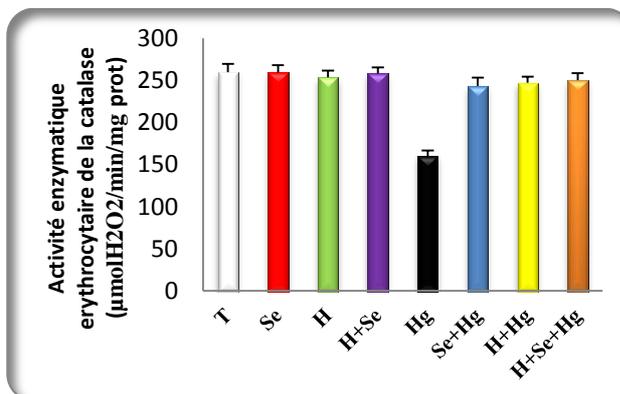
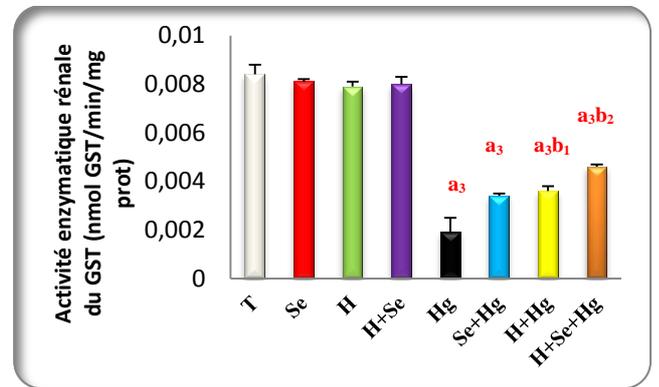
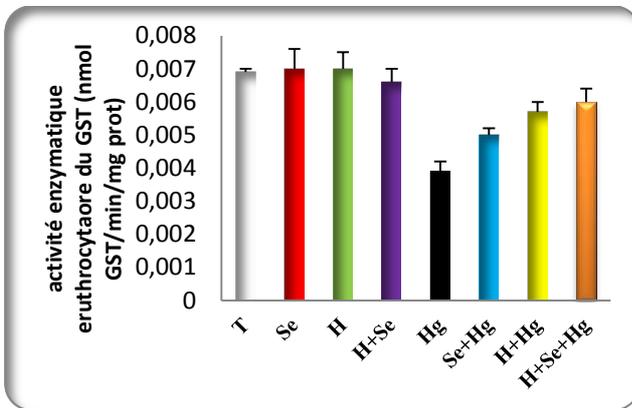
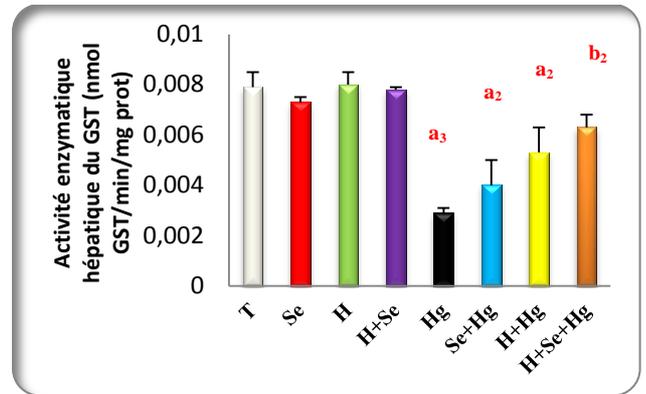
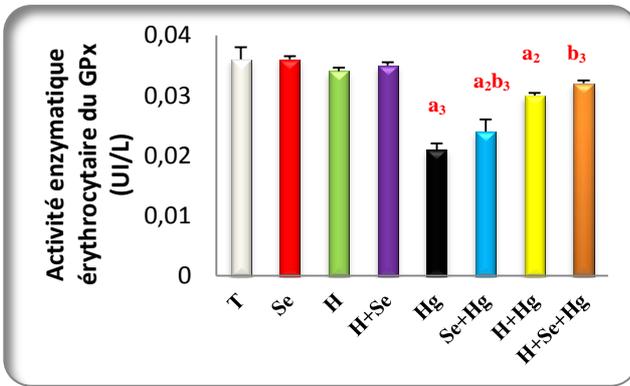
**b<sub>1</sub>** : Différence significative comparant au lot traité par chlorure de mercure ( $P \leq 0,05$ ).

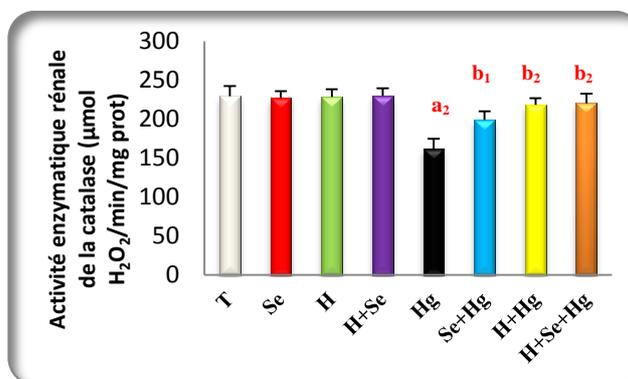
**b<sub>2</sub>** : Différence hautement significative comparant au lot traité par le chlorure de mercure ( $P \leq 0,01$ ).

**b<sub>3</sub>**: Différence très hautement significative comparant au lot traité par le chlorure de mercure (P≤0,001).

**P**: seuil de signification.







**Figure 36** : variation de l'activité enzymatique de SOD, GPx , GST et Catalase hépatique, rénale et érythrocytaire chez le lot témoin et les lots traités par le Se, H, Se/H, Hg, Se/Hg, H/Hg et H +Se /Hg après 21 jours de traitement.

**a<sub>1</sub>** : Différence significative comparant au témoin ( $P \leq 0,05$ ).

**a<sub>2</sub>** : Différence hautement significative comparant au témoin ( $P \leq 0,01$ ).

**a<sub>3</sub>** : Différence très hautement significative comparant au témoin ( $P \leq 0,001$ ).

**b<sub>1</sub>** : Différence significative comparant au lot traité par chlorure de mercure ( $P \leq 0,05$ ).

**b<sub>2</sub>** : Différence hautement significative comparant au lot traité par le chlorure de mercure ( $P \leq 0,01$ ).

**b<sub>3</sub>** : Différence très hautement significative comparant au lot traité par le chlorure de mercure ( $P \leq 0,001$ ).

**P** : seuil de signification.

### 2.8.2. Discussion

Nos résultats confortent ces travaux puisque nous avons mis en évidence une diminution de GSH érythrocytaire, hépatique et rénale, métallothionéine, et les enzymes antioxydantes (SOD, GPx, GST et catalase) dans le foie et les reins et augmentation dans le taux de la peroxydation lipidique exprimé par MDA plasmatique, hépatique, rénale et érythrocytaire chez les rats traités par le mercure pendant 21 jours comparants aux témoins.

Face au dommage oxydatif causé par les radicaux libres oxygénés, et à l'effet toxique provoqué par les métabolites actifs des xénobiotiques, la cellule vivante peut se défendre grâce à plusieurs systèmes de détoxification dont le plus important est celui du glutathion (Kaplowitz *et al.*, 1985). D'après les résultats obtenus, le traitement des rats par le mercure (0.25 mg/Kg de poids corporel) pendant 21 jours a provoqué une diminution de la teneur hépatique et rénale en glutathion (Deepmala *et al.*, 2013). L'un des effets malfaisants d'action du mercure dans le corps est d'induire la formation des espèces oxygénées réactives (ROS) ainsi que l'augmentation de la peroxydation lipidique dans les cellules (Das *et al.*, 2000). Les radicaux libres et les produits intermédiaires de la peroxydation lipidique sont capables d'endommager l'intégrité et changer la fonction des biomembranes qui peut mener au développement de beaucoup de processus pathologiques (Das *et al.*, 2004). Le GSH est un tripeptide qui joue un rôle à divers niveaux dans la lutte contre le stress oxydant (Masella *et al.*, 2005). Le MT est une petite protéine qui intervient comme ligand avec les métaux lourds grâce à leur teneur élevée en groupement sulfhydryle. La déplétion du taux de glutathion et MT dans cette étude s'explique par sa participation dans les mécanismes de détoxification de ce xénobiotique là que forme un complexe avec le mercure dans le foie et le rein qui est ensuite excrété et l'inhibition de la peroxydation lipidique par la disparition des radicaux libres (Li *et al.*, 1999 ; Satsangi et Dua, 2001).

Le mercure peut contribuer à l'oxydation de glutathion et MT ou lie à son groupement sulfhydryle ; donc il abaisse le taux du glutathion et MT dans les cellules hépatiques et rénales. En outre, Deepmala *et al.* (2013) ont montré que l'administration intra-péritonéale du chlorure de mercure chez les rats augmente la peroxydation lipidique dans le foie et le rein et réduit le glutathion.

Le mercure se lie exclusivement au pol (-SH) du GSH et MT chargé à son inactivation ce qui favorise la peroxydation lipidique et l'apparition des radicaux libres, qui augmente la susceptibilité des lésions tissulaires importantes dans les différents tissus (Pari et Parath, 2008) ce qui conforme les observations de l'histologie hépatique et rénale des rats traités au

mercure ont observés aussi une baisse dans les concentrations de GSH, MT suivant le traitement au mercure.

Les cellules possèdent d'autres systèmes de défense antioxydant incluent des enzymes comme les SOD, GPx, GST et catalase. Nos résultats montrent une diminution claire de l'activité de ces enzymes dans le foie et les reins chez les rats traités par le mercure en comparant aux témoins. La diminution de l'activité de SOD, le chef de file des défenses antioxydantes au niveau cellulaire. La SOD permet de convertir l'anion superoxyde en oxygène et en peroxyde d'hydrogène (Toxique). À défaut de cette réaction  $H_2O_2$  va réagir avec les ions fer et générer des réactifs hautement toxiques pour les acides nucléiques des cellules (formation du radical libre le plus puissant,  $OH^\bullet$ ). Ce dernier doit être détoxifié par la glutathion peroxydase, qui peut réduire le peroxyde d'hydrogène en eau en présence du glutathion et permettre également de limiter la propagation des réactions radicalaires en chaîne en réduisant les peroxydes instables en acides gras hydroxylés. La catalase est un composant majeur dans le système enzymatique d'antioxydant fondamental qui catalyse la décomposition de  $H_2O_2$  à  $H_2O$  et  $O_2$  et partage cette fonction avec la glutathion peroxydase (Valko *et al.*, 2006). Les niveaux de ces antioxydants peuvent fournir une indication claire sur l'ampleur de dégât cytotoxique qui se produit dans plusieurs tissus (Sies, 1993). D'autre part, la diminution des activités des enzymes antioxydants peut être due à l'action directe de ce métal de se lier au site actif des enzymes ou à la cotisation à leur usage augmenté d'ébouer des radicaux libres induit par le métal donc causer l'inhibition irrévocable de leur activité. D'autre part, le mercure a été rapporté pour déclencher la production d'oxyde nitrique (Gupta *et al.*, 2000 ; Joshi *et al.*, 2004). Qui est connu pour empêcher l'activité des enzymes antioxydantes en liant à son groupe prosthétique. Ces effets mènent probablement à l'accumulation de  $H_2O_2$  qui réagit avec du  $O_2$  et produit de l' $OH^\bullet$ , un initiateur de la peroxydation de lipide (Chakrabarti et Bai, 1999 ; Huang *et al.*, 2001 ; Chen *et al.*, 2003). La diminution de l'activité de GST chez les rats traités par le mercure comparés aux témoins, cette diminution peut être expliquée par sa participation dans les réactions de conjugaison des composés toxiques électrophiles dérivant du métabolisme de mercure avec le GSH pour former les acides mercapturiques non toxiques excrétés dans les urines.

L'augmentation observée du taux du glutathion érythrocytaire, hépatique et rénale, le métallothionéine et l'activité des enzymes antioxydantes (SOD, GPx, GST et catalase) dans le foie et les reins suivant l'administration du sélénium par apport aux rats traités par le mercure, pourrait être à cause de sa propriété pour induire des métallothionéines (protéine riche SH) qui joue un rôle d'un chaperon des radicaux libres (Viarengo *et al.*, 2000 ; Yoshida *et al.*,

2005). Ou son action indirect à réduire les niveaux des espèces réactives d'oxygène, qui est due la plupart du temps de sa haute affinité pour les métaux lourds (Klassen *et al.*, 1999), par conséquent résulter en stress oxydant réduit (Sidhu, 2004 ; Pari et Pasath, 2008). Xia *et al* (2003) démontrent que le sélénium entraîne comme ligand dans la plupart des enzymes antioxydant, surtout GPx et Thioredoxine. L'effet protecteur de sélénium contre la toxicité du mercure peut être due à la formation d'un complexe Hg-Se au niveau du plasma qui est excrétable (Perotoni *et al.*, 2004 b). Le sélénium semble réduire la toxicité de plusieurs métaux par la formation de composés sélénures (Produits de sélénites en présence de glutathion) inertes. Les mécanismes de ces interactions sont encore peu connus. Le sélénite ( $\text{Se}^{+4}$ ) peut présenter des propriétés pro-oxydantes tout comme le mercure  $\text{Hg}^{+2}$  lorsqu'il est administré seul. Cependant, cette toxicité du sélénite semble rapidement diminuer lorsque le sélénide se forme en présence de glutathion. De plus, le sélénure forme un complexe Hg-Se/S lequel Se lie ensuite à une sélénoprotéine P, pour former un complexe tertiaire (Hg-Se (S)-sel-P (Perotoni *et al.*, 2004b). La littérature rapporte que les ions mercure se lient au sélénium pour former un composé biologiquement inactif et la toxicité de ce complexe est très faible comparé à celle des deux sels qui le forment : chlorure de mercure et sélénite de sodium. Chez les rats traités par le mercure, le mercure probablement produit une très forte inhibition d'un grand nombre d'enzymes antioxydantes ayant des groupements fonctionnels thiols (SH), le mercure ce qui changerait la conformation de l'enzyme et l'inactiverait. Encore une fois, l'addition de sélénium restaure les propriétés des enzymes touchées par le mercure, probablement en se complexant avec le mercure. L'étude de Yoneda and Suzuki (1997) démontre que l'administration de même volume de Hg et Se chez le rat capable de former un complexe Hg-Se qui ensuite lie avec sélénoprotéine et finalement excrété.

L'augmentation de taux du glutathion, métallothionéine et les enzymes antioxydantes après le traitement par l'huile d'argan peut être due à la forte teneur de l'huile d'argan en composé antioxydants qui inhibent la production des radicaux libres. Une étude récente démontre que les saponines d'*Argania Spinosa* inhibent la dégradation du lipide par les radicaux libres, et ont une action anti-radicalaire contre les radicaux OH (Alaoui *et al.*, 1998b). D'autre explication peut être due à l'action des certains constituants active de l'huile d'argan qui joue un rôle antioxydant et provoque de scavenger des radicaux libres par le système enzymatique. Les antioxydants de l'huile d'argan capable d'éliminer ou d'inhiber l'oxydation des lipides et autres molécules cibles à l'action du mercure par l'inhibition de l'initiation ou la propagation de réaction des chaînes oxydatives. Le rôle protecteur de l'huile d'argan contre le stress oxydatif induit par le mercure probablement du par sa richesse en

grand quantité des antioxydants, particulièrement : les AGPI et insaturé, les polyphénols, les tocophérols, stérols et  $\beta$ -carotène (Masella *et al.*, 2001). L'effet antioxydant de l'huile d'argan peut être réalisé par plusieurs mécanisme parmi ces mécanisme on peut citer l'effet scavenger de radical peroxyde qui est responsable sur la chaîne de la peroxydation lipidique. D'autre mécanisme que l'huile d'argan capable de chélates le  $\text{Cu}^{+2}$  libre et donc réduire la liaison de  $\text{Cu}^{+2}$  à apolipoprotéines et empêchant par la suite la modification des résidus de protéines (Fuhram *et al.*, 1995), ainsi que les acides gras polyinsaturé et insaturé de l'huile d'argan ont des effets protecteurs contre le stress oxydatif induit par le mercure grâce a la présence des doubles liaison qui est difficile à oxyder d'une part et impliqué dans la fluidité des lipoprotéines d'autre part (Sola *et al.*, 1993). L'activité antioxydante des polyphénols de l'huile d'argan est principalement défini par la présence de substituant orthodihydroxy qui stabilisent et chélates les radicaux libres.

L'effet antioxydant d'acide phénolique et leurs esters de l'huile d'argan dépend du nombre de groupes hydroxyle dans la molécule. L'huile d'argan avec comparaison à l'huile d'olive, constituent une plus grande quantité d'acide férulique (Kweon *et al.*, 2001) ce acide est plus efficace que l'acide ascorbique et d'autres acides phénolique tels que l'acide P-coumarique qui est capable de donner électrons à partir de group methoxy, permet d'augmenter la stabilisation de radical aryloxyyl résultant par délocalisation électronique après prélèvement d'hydrogène du group hydroxyle (Faraji *et al.*, 2004). Cela montre que l'inhibition directe de la formation de l'isomère trans-diènehydroperoxyde conjugué est lié à la capacité H donneur du phénol.

L'huile d'argan mais pas l'huile d'olive ou huile de tournesol, contient également un autre important acide phénolique : acide syringique qui protège les cellules contre la peroxydation lipidique. Ces données suggèrent un rôle potentiel des polyphénols antioxydants dans la protection des cellules vivante. Les b-carotène de l'huile d'argan capable de scavenger des radicaux libres produit par le mercure et de réduire la peroxydation lipidique, le mécanisme antioxydant de b-carotène a été suggéré d'être trempe d'oxygène singlet piègeur des radicaux libres et la rupture de la chaîne pendant la peroxydation lipidique (Gerster, 1993 ; Garg *et al.*, 2005).

L'huile d'argan contient également une grande quantité de tocophérol peut être joue un rôle comme piègeure de peroxyde lipidique (LOO) et d'autres radicaux, et d'inhiber la peroxydation au niveau de la membrane et maintient les taux élevée d'acide ascorbique et de GSH dans des tissus endommagés par la toxicité du mercure et ce par l'inhibition de la formation des radicaux libres.

Dans la présente étude le taux érythrocytaire, hépatique, rénale et plasmatique de MDA chez les rats traités par le mercure est significativement augmenté par rapport aux rats témoins. La concentration élevée de MDA est un indice qui suggère qu'il ya une forte peroxydation lipidique au niveau du sérum, du foie et des reins suite à l'injection de mercure, cette augmentation de la concentration du MDA , peut être due à la diminution des antioxydants enzymatique et non enzymatique , comme l'acide ascorbique et le tocophérol qui jouent un rôle coopératif très importants dans l'inhibition du phénomène de la lipide peroxydation et la formation de ses produits dangereux au niveau cellulaire (Vertuani *et al.*, 2004).

Le traitement avec le sélénium réduit les concentrations en substances réactives à l'acide thiobarbiturique érythrocytaire, plasmatique, hépatique et rénale. Ces résultats sont probablement dus à une inhibition de la génération des radicaux libres oxygénés, secondaire à la stimulation de l'activité des enzymes antioxydantes.

On note après l'administration orale de l'huile d'argan conduit à une diminution significative de MDA par rapport au témoin, ceci est en concidence avec d'autres études (Drouiche *et al.*, 2005; Adil *et al.*, 2013 ). L'effet inhibiteur de la peroxydation lipidique par l'huile d'argan traduit par sa richesse en polyphénols et les tocophérols qui jouent un rôle très important dans la neutralisation des radicaux libres formé lors de la peroxydation lipidique, donc l'huile d'argan joue son rôle au niveau de la phase de propagation. Une autre explication de l'effet inhibiteur de l'huile d'argan est la grande capacité qu'il a pour la chélation des oligo-éléments tels que le fer, Un élément très actif dans l'induction de la peroxydation lipidique.

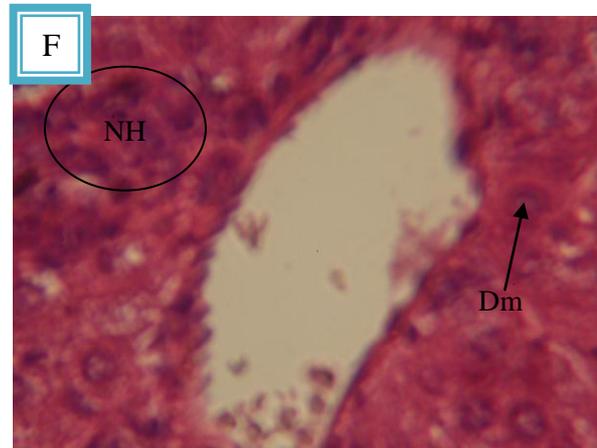
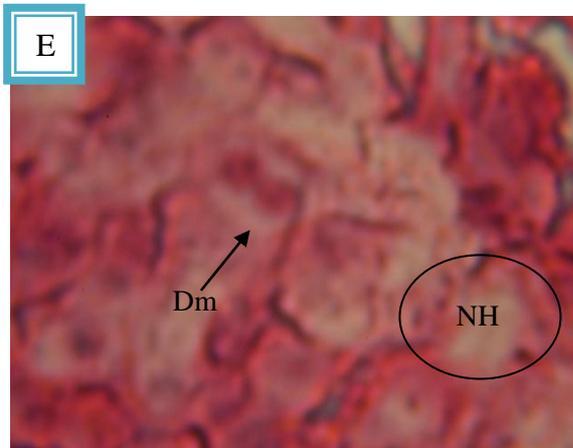
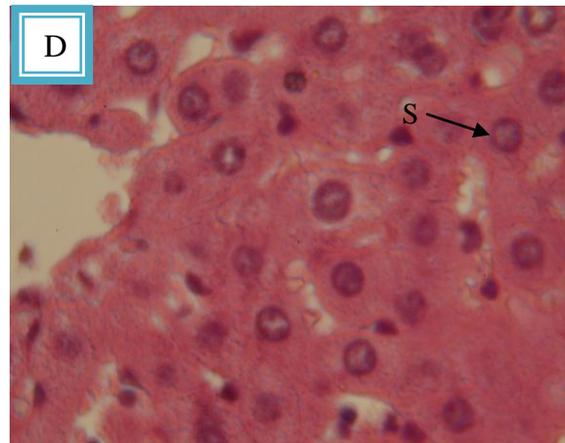
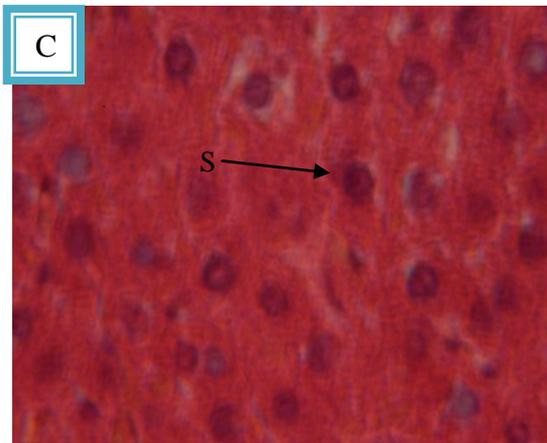
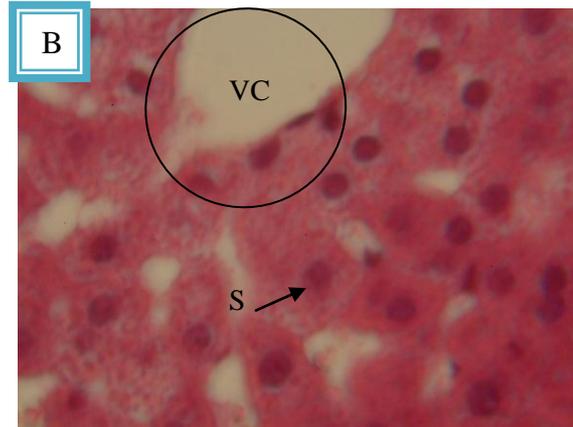
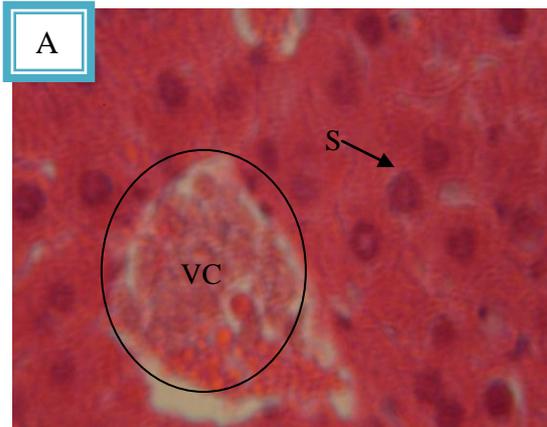
## **2.9. Influence du traitement sur les variations histologiques**

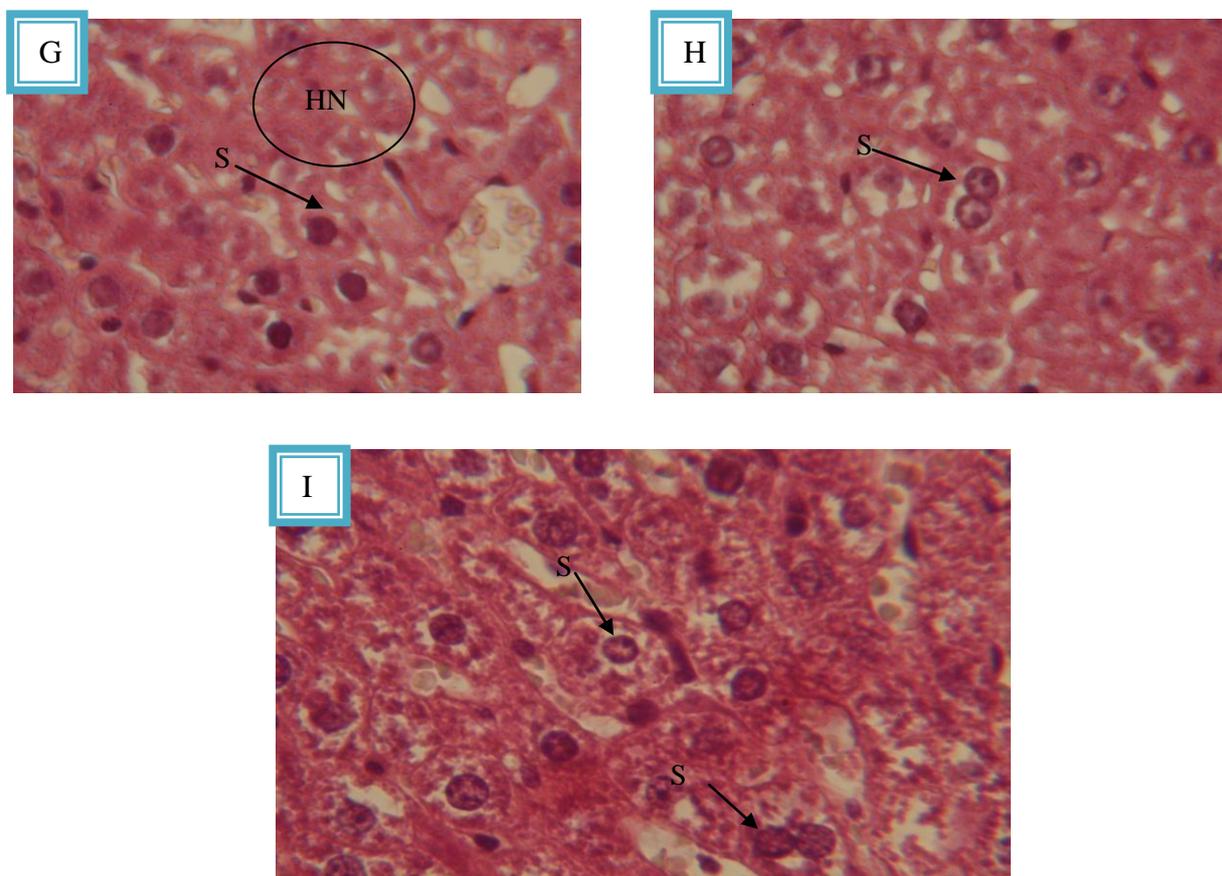
### **2.9.1. Résultats**

#### **➤ Au niveau du foie**

L'histologie du foie d'un rat du lot témoin (fig. 37.A) montre des cellules hépatiques normales, un cytoplasme granuleux et préservé avec veine centrale clairement visible. Chez les lots traités par l'huile d'argan ou/et sélénium (fig. 37. B, C, D), l'histologie du foie montre qu'il a une structure presque normale. Pour le lot des rats traités par le mercure (fig. 37. E, F) on note une altération sévère de l'architecture du foie avec veine centrolobulaire dilatée, hépatocytes irrégulières ballonnées, inflammation et nécrose. Alors que pour les lots traités au mercure et traités par l'huile d'argan ou / et sélénium (fig. 37 G, H), des congestions

vasculaires avec veine centrolobulaire dilatée ont été notées mais en générale l'architecture semble intacte.



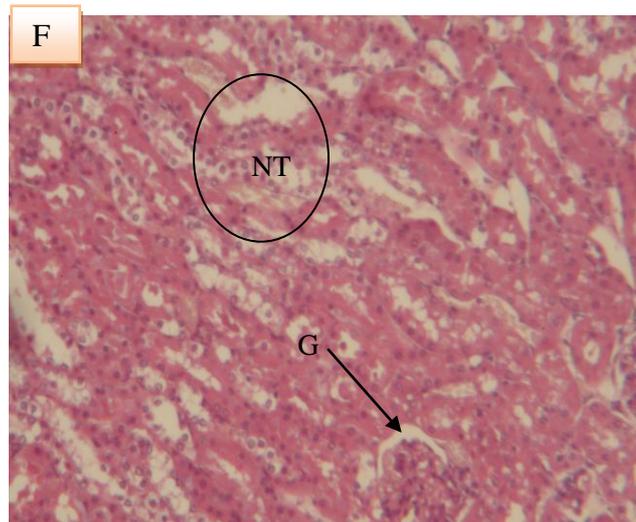
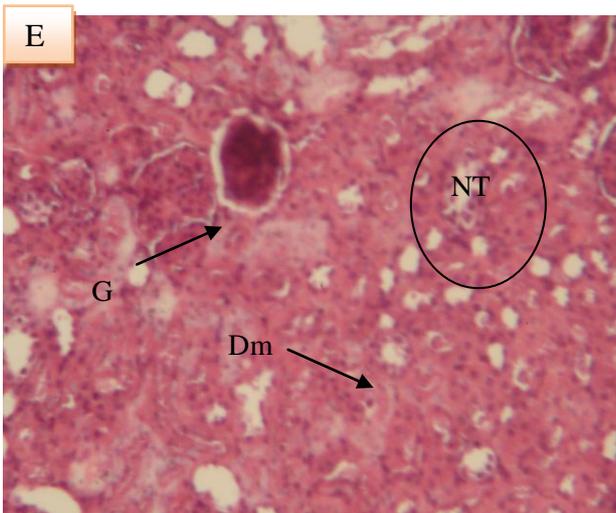
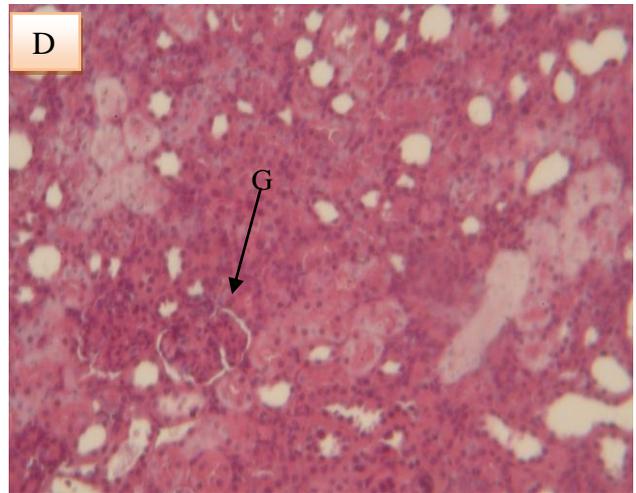
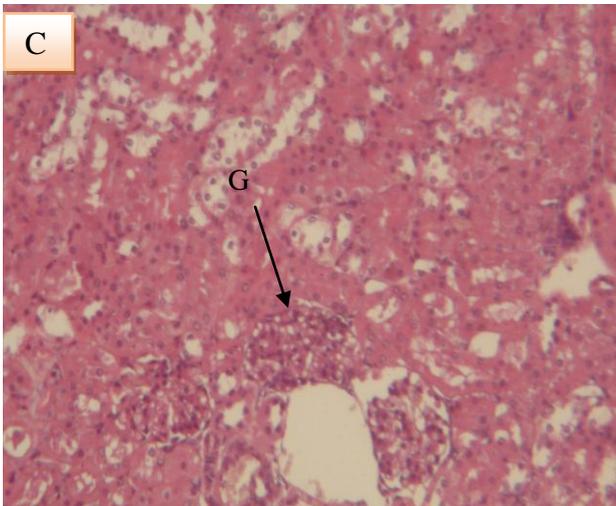
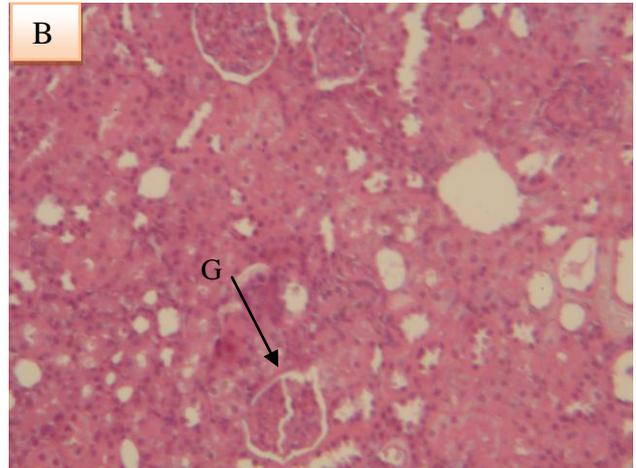
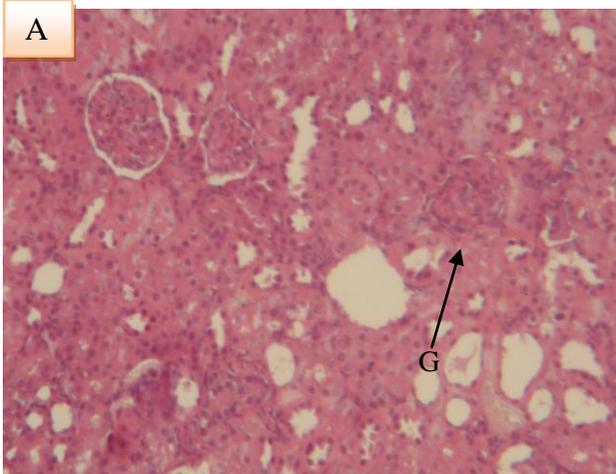


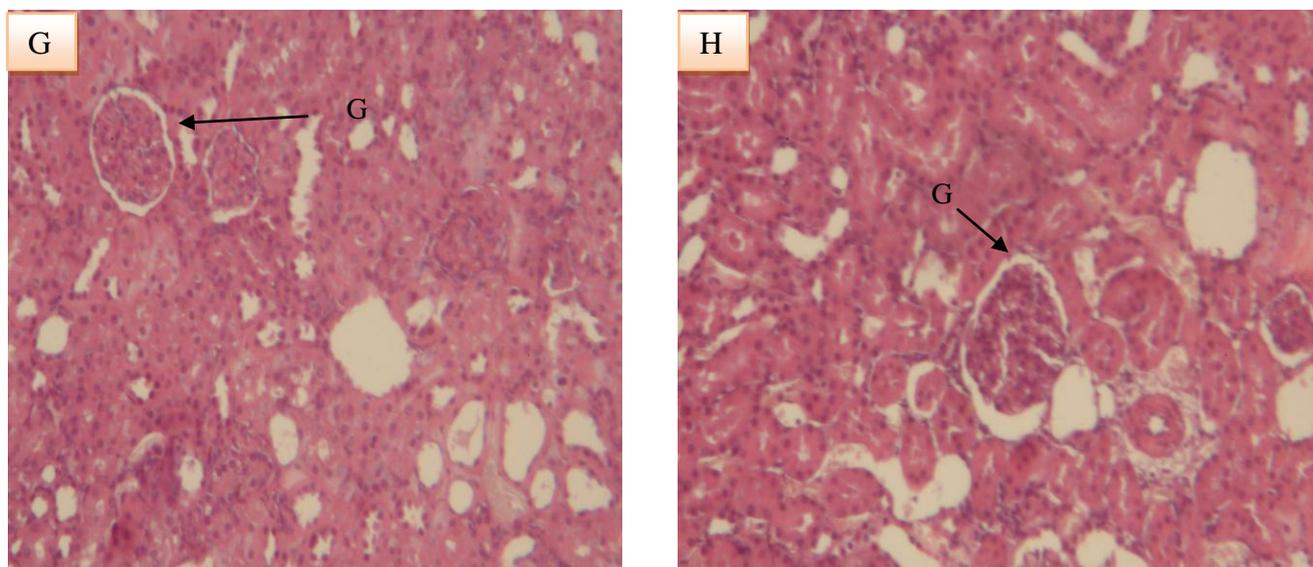
**Figure 37 :** les coupes histologiques du foie du rat témoin (A) et traités par le Se (B), H (C), Se/H (D), Hg (E, F), Se/Hg (G), H/Hg (H) et H +Se /Hg (I) après 21 jours de traitement. Coloration à l'hématéine –éosine. (X400).

**S :** Sinusoides, **Dm :** destruction membranaire, **NH :** Nécrose hépatocytaire.

➤ *Au niveau des reins*

L'histologie du cortex rénal d'un rat du lot témoin (fig. 38. A) a montré la présence de glomérules uniformes avec membrane bien définie. Chez les lots traités par l'huile d'argan ou/et sélénium (fig. 38. B, C, D) l'histologie du cortex rénale montre qu'il a une structure presque normale. L'architecture du cortex rénal chez le rat du lot mercure (fig. 38. E) était sévèrement altérée où la plus part des glomérules sont nécrosés. Pour les lots contaminés au mercure et traités par l'huile d'argan ou/et sélénium (fig. 38.F, G, H) les glomérules paraissent plus grands et non arrondis (dilatés). Malgré ces altérations notées chez les derniers lots, l'architecture du cortex rénale reste plus intacte que celle observée chez le lot contaminé par le mercure.





**Figure 38** : les coupes histologiques de rein du rat témoin (A) et traités par Se (B), H (C), Se/H (D), Hg (E), Se/Hg (F), H/Hg (G) et H +Se /Hg (H) après 21 jours de traitement. Coloration à l'hématéine –éosine. (X100).

**G**: Glomérule, **Dm** : destruction membranaire, **NT** : Nécrose tubulaire.

### 2.9.2. Discussion

Ainsi, l'observation des coupes histologiques que nous avons réalisée révèle que la toxicité du mercure s'est manifestée par des atteintes tissulaires sans équivoque, au niveau du foie et des reins. Ces altérations sont induites, au cours d'un stress oxydatif, par l'augmentation de la peroxydation des lipides. Il en résulte l'activation d'inflammations cellulaires et une dégradation des produits lipidiques (Milton Prabu *et al.*, 2011).

De nombreuses recherches ont démontré que les radicaux oxygénés libres sont à l'origine de ces altérations (Thevenod *et al.*, 2000). En effet, ces radicaux peuvent diffuser dans le cytoplasme et à travers les membranes, pour aller attaquer des composants cellulaires éloignés de leur site de production ou encore pour atteindre d'autres cellules. L'attaque des composants organiques des cellules (lipides, protéines ou glucides) permet la transmission du caractère radicalaire et déclenche ainsi des pathologies sévères allant jusqu'à la mort des animaux.

Il a été signalé que l'exposition subchronique par voie orale du mercure entraîne de multiples nécroses au niveau du foie associé à des changements de l'ultra-structure et des altérations hépatiques (Necib *et al.*, 2013a), de dégénérescences des tubes rénaux ont été observés

également chez les rats traités aux différentes doses par voie orale au chlorure du mercure (Augusti *et al.*, 2008 ; Necib *et al.*, 2013c).

Bien que le modèle lamellaire d'hépatocytes a été restauré à presque normal chez le lot traité par le sélénium, ce peut être attribué à la capacité du sélénium à réduire la menace des radicaux oxygénés ce qui mène à la réduction de changement pathologiques notre résultat est en accord avec les travaux de Joshi *et al* (2014).

Une prévention significative des dommages oxydatifs a été noté pour les lots traité par l'huile d'argan et le mercure, ces résultats peuvent être dus a la présence des substances bioactives dans l'huile d'argan qui exerce leur effet protecteur contre les dommage du stress oxydant au niveau du foie et des reins.

D'après les résultats actuels, on peut conclure que l'utilisation de l'huile d'argan, le sélénium ou/et de leur combinaison sont la capacité à améliorer la plupart des effets nocifs induite par le mercure.

## Conclusions générales et perspectives

En conclusion, nos résultats montrent dans un premier temps que l'administration de chlorure de mercure à 0.25mg/kg de poids corporel par injection intrapéritonéale chez les rats adultes pendant 21 jours, a provoqué des perturbations du système enzymatiques de détoxification. L'apparition d'atteintes tissulaires causées au niveau métabolique, associée à une perturbation des paramètres biochimiques, hématologiques et immunologiques. Dans un second temps, nos résultats montrent que l'addition de l'huile d'argan (5ml/kg) et du sélénium (0.25mg/kg) avec le mercure a amélioré la plus parts des paramètres étudiés.

✚ L'étude phytochimique montre :

- l'huile d'argan possède un pouvoir anti-radicalaire plus élevé par rapport le sélénium.

✚ L'étude physiologique montre :

- Une diminution du poids corporel durant la période de traitement.
- une augmentation des poids relatifs des organes (foie, reins et la rate) chez les rats traités par le mercure par rapport aux témoins.

✚ L'étude des paramètres biochimiques montrent :

- une augmentation de la concentration sérique en glucose, urée, créatinine, l'acide urique, bilirubine totale et direct, lipide totaux, cholestérol, triglycérade et le diène conjugué chez les rats traités par le mercure par rapport aux témoins.
- une augmentation de l'activité sérique des enzymes transaminases (AST, ALT), phosphatase alcaline et LDH chez les rats traités par le mercure par rapport aux témoins, ce qui confirme l'effet hépatotoxique du mercure.
- une diminution de la concentration sérique en Protéine total et albumine chez les rats traités par le mercure par rapport aux témoins.

✚ L'étude hématologique montre :

Une augmentation de nombre des globules blancs et une diminution des globules rouges, d'hémoglobine et l'hématocrite chez les rats traités par le mercure par rapport aux témoins.

✚ L'étude immunologique montre :

Une augmentation dans la concentration sérique des Cytokines pro-inflammatoire (IL1, IL6, TNF), le taux de la clairance de carbone et une diminution dans l'activité phagocytaire chez les rats traités par le mercure par rapport aux témoins.

- ✚ L'étude de la capacité anti-oxydante plasmatique montre :  
Une diminution de la concentration sérique de la vitamine E et C, le DPPH et les thiols plasmatique.
- ✚ l'étude des paramètres du stress érythrocytaire et tissulaire montre:
  - une diminution du taux de glutathion érythrocytaire, hépatique et rénal chez les rats traités par le mercure par rapport aux témoins.
  - Une diminution de taux de metallothionéine hépatique et rénal chez les rats traités par le mercure par rapport aux témoins.
  - Une augmentation de taux de MDA plasmatique, érythrocytaire, hépatique et rénal chez les rats traités par le mercure par rapport aux témoins.
  - Une diminution dans l'activité enzymatique de SOD,GPx, GST et catalase érythrocytaire, hépatique et rénal chez les rats traités par le mercure par rapport aux témoins.

Ces perturbations enregistrées avec le mercure sont améliorées par l'addition de l'huile d'argan et le sélénium ce qui peut témoigner de l'effet antioxydant et protecteur de ce deux antioxydants contre l'effet oxydatif du mercure.

- ✚ L'étude histologique montre:  
Les résultats illustrent l'apparition des nécroses hépatiques et rénales. Ces lésions histologiques sont moins importantes chez le lot traité par l'huile d'argan et le sélénium que celui traité au mercure seul.

Il serait judicieux de compléter cette recherche par une étude approfondie s'intéressant aux mécanismes de défense radicalaire par le dosage d'autre marqueurs du stress oxydatif (rapport GSH/GSSG, GR, vitamine E...etc), ainsi une étude in vitro (culture cellulaire) sur le pouvoir anti-radicalaire de l'huile d'argan.

## Références

### *A*

- Abuja PM, Albertini R.** (2001). Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins. *Clinica Chimica Acta*. 306, 1-17.
- Adlouni, A.** (2010). L'huile d'argan, de la nutrition à la santé. *Phytothé*. 8, 89-97.
- Adlouni A, Cherki M, Khalil A, El Messal M.** (2009). Argan oil may reduce cardiovascular risk associated with obesity. *Athero-sclerosis*. 10, 385.
- Aebi H.**(1974). Catalase. *Methods of Enzymatic Analysis*. Academic Press NY. 2, 673-684
- Afssa.** (2002). Rapport relatif à l'équivalence en substance de l'huile d'argan (*Argania spinosa* L. Skeels) avec d'autres huiles alimentaires conformément à l'article 5 du règlement CE 258/97 relatif aux nouveaux aliments et nouveaux ingrédients. 8P.
- Agrwal R, Behari JR.** (2007). Effect of selenium pretreatment in chronic mercury intoxication in rats. 79,306-10.
- Amara S, Abdelmelek G, Guiraud P, Douki T, Ravanat JL, Favier A, Sakly M, Ben Rhoumak K .**(2008) . Preventive effect of zinc against cadmium induced oxidative stress in the rat testis. 54, 129-134.
- Asada K, Takahashi M, Nagate M.** (1974). Assay and inhibitors of spinach superoxide dismutase. *Agric Biol Chem*. 38, 471-3.
- Association Française de Normalisation (AFNOR)** Recueil de normes françaises des corps gras, graines oléagineuse, produits dérivés, 3ème édition, 1984.
- Atikah FD, Siddik N, Sembiring TB, Ariani A.** (2009). The effect of dietary intervention and physical activities on the lipid profile of obese children. *Pediatr Indones*. 2, 108-111.
- Augusti PR, Conterato GMM, Somacal R, Spohr Torres JV, Charao MF, Moro AM, Rocha MP, Garcia SC, Emanuelli T .**(2008). Effect of astaxanthin on kidney function impairment and oxidative stress induced by mercuric chloride in rats. *Food and Chem Toxicol*. 46, 212-219.

5

- Barbagallo M, Dominguez L, Galioto A, Ferlisi A, Cani C, Malfa L.** (2003). Role of magnesium in insulin action, diabetes and cardio-metabolic syndrome X. *Mol Aspects.* 24, 39-52.
- Barbara JA, Van ostade X & Lopez A.** (1996). Tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha): the good, the bad and potentially very effective. *Immunol Cell Biol.* 74, 434-443.
- Barnes P J.** (1998). Anti-inflammatory actions of glucocorticoids : molecular mechanisms. *Clin Sci.* 94. 557-572.
- Barouki R.** (2006). Stress oxydant et vieillissement. *Medecine/sciences n°3*, 22, 266-72.
- Barr RD, Woodger BA, Rees PH.** (1973). Levels of mercury in urine correlated with the use of skin lightening creams. *Am J Clin Pathol.* 59, 36–40.
- Barreto M.** (2005). Lipid extraction and cholesterol quantification. *J Chem Educ.* 82, 103-104.
- Baskin SI, Salem H.** (1994). Oxidant, Antioxidant and Free Radicals. *Academic press Inc.* 363, pp 25-62.
- Beaudeux JL, Delattre J, Peynet J.** (2003). Lipoprotéines et athérosclérose : mécanismes moléculaires et cellulaires. In : Delattre J, Durand G, Jardillier JC. *Biochimie pathologique : aspects moléculaires et cellulaires.* Médecine-Sciences Flammarion, Paris. pp 91-107.
- Beck PA.** (2005). Effects of Feeding Supplemental Organic or Inorganic Selenium to Cow-Calf Pairs on Selenium Status and Immune Responses of Weaned Beef Calves. *Prof Anim Sci.* 21, 114-120.
- Becker BF.** (1993). Towards the physiological function of uric acid. *Free Radic Boil Med.* 14, 615-13.
- Bellahcen S, Mekhfi H, Ziyat A, Legssyer A, Hakkou A, Aziz M and Bnouham M.** (2012). Prevention of chemically induced diabetes mellitus in experimental animals by virgin argan oil. *Phytother Res.* 26, 180-185.
- Benajiba S, Morel F, Boucher J, De Leiris N, Mokhtar HA.** (2002). Effet de l'huile d'argan sur la fonction cardiaque au cours d'une séquence d'ischémie/reperfusion chez le rat Wistar recevant un régime enrichi en fructose. *Biol Santé.* 2, 67–76.
- Bennani A, Drissi F, Giton L, Kheuang J, Fiet AA.** (2007). Antiproliferative effect of polyphenols and sterols of virgin argan oil an human prostate cancer cell lines. *Cancer Detect Prev.* 31, 64–69.

- Benabid.A et Fennana.M.**(1994). Connaissance sur la végétation du Maroc: phytothérapie, phytosociologie et série de végétation, Lazaroa. 21-97
- Benoit M, Desnues B & Mege JL.** (2008). Macrophage polarization in bacterial infections. *J Immunol.* 181, 3733-3739.
- Bensefat-Colas L, Andujan P, Descathar A.** (2011). Intoxication au mercure. *Rev Med Inter.* 32(7), 416-42.
- Benzaria A, Meskini N, Dubois M, Croset M, Nemoz G, Lagarde M and Prigent AF.** (2006). Effect of dietary argan oil on fatty acid composition, proliferation, and phospholipase D activity of rat thymocytes. *Nut.* 22, 628-637.
- Berrada Y, Settaf A, Baddouri K, Cherrah A, Hassar M.** (2000). Experimental evidence of an antihypertensive and hypocholesterolemic effect of oil of argan. *Argania sideroxylon. Therapie.* 55, 375–378
- Berrougui H, Ettaib A, Herrera Gonzalez MD, Alvarez de Sotomayor M, Bennani Kabchi N, Hmamouchi M.** (2003). Hypolipidemic and hypocholesterolemic effect of argan oil (*Argania spinosa* L.) in Meriones shawi rats. *J Ethnopharmacol.* 89, 15–8.
- Berrougui M, Alvarez de Sotomayor C, Perz-Guerrero A, Attaib M, Hmamouchi E, Marhuenda M D H.** (2004), Argan (*Argania spinosa*) oil lowers blood pressure and improves endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rats. *Br J Nutr.* 92, 921–929.
- Berrougui M, Cloutier M, Isabelle A K.** (2006). Phenolic extract from argan oil (*Argania spinosa* L.) inhibits low-density lipoprotein (LDL) oxidation and enhances cholesterol efflux from human THP-1 macrophages. *Athero.* 184, 389–396.
- Berrougui H, Cloutier M, Isabelle M, et al.** (2006). Phenolic-extract from argan oil (*Argania spinosa* L.) inhibits human low-density lipoprotein (LDL) oxidation and enhances cholesterol efflux from human THP-1 macrophages. *Athero.* 184, 389–396.
- Biozzy G, Benacerra FB, Halperm BN.** (1970). Effect de la vaccination par plasmodium berghi irradié sur l'activité phagocytaire du système réticulo-endothélial au cours de l'infection du rat par plasmodium bulleti de l'organisme mondiale de la santé. 42(1), 163-168.
- Blain J, Netter J.** (2000). Les anti-inflammatoires non stéroïdiens inhibiteurs sélectifs de la cyclooxygénase 2. Intérêt et perspectives. *Rev Méd Interne.* 21, 978-88.

- Bonnefont-Rousselot D, Thérond P, Beaudeau JL, Peynet J, Legrand A, Delattre J.** (2001). Vieillesse et stress oxydant. Quels marqueurs potentiels ?. *Ann Biol Clin.* 59(4), 453-459.
- Bradford MA.** (1976). Rapid and sensitive method for the quantities of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72, 248-54.
- Brigelius-Flohe R, Banning A, Schnurr K.** (2003). Enzymes in endothelial cell function. *Ant Red Signal.* 5, 205-15.
- ⌘
- Cabrera-Vique C, Marfil R, Gimenez R and Martinez-Augustin O.** (2012). Bioactive compounds and nutritional significance of virgin argan oil--an edible oil with potential as a functional food. *Nutr Rev.* 70, 266-279.
- Cadet J, Delatour T, Douki T, Gasparutto D, Pouget JP, Ravanat JL, Sanvaigo.** (1999). Hydroxyl radicals and DNA base damage. *Mutat.* 424, 9-21.
- Cempel M, Janicka k.** (2002). Distribution of nickel, zinc, and copper in rat organs after oral administration of nickel (II) chloride. *Boil trace Elem. Res.* 90, 215-226.
- Chakrabarti SK, Bai CJ.** (1999). Role of oxidative stress in nickel chloride induced cell injury in rat renal cortical slices. *Bioch Pharm.* 58(9), 1501-1510.
- Charles N S, Peter A W and Derek W G.** (2010). Fundamentals of Inflammation. *Cambridge University Press*, 2-3.
- Charrouf Z, Guillaume D.** (1998). Ethnocomonomical, ethnomédical, and phytochemical study of (*Argania spinosa* (L) Skeels). *J of ethnopharmacol.* 67, 7-14.
- Charrouf Z.** (1995). Valorisation des produits de l'arganier In: actes des journées d'étude sur l'arganier, Essaouira, 29-30 septembre
- Charrouf Z, Guillaume D.** (1999). Ethnoeconomical, ethnomedical and phytochemical study of *Argania spinosa* (L.) Skeels. *J Ethnopharmacol.* 67, 7-14.
- Charrouf Z, and Guillaume D.** (2008). Argan oil: Occurrence, composition and impact on human health. *Eur J of Lipid Sci and Tech.* 110, 632-636.
- Chen D, Diao L and Eulenstein O.** (2003). Flipping: A supertree construction method. In Janowitz, M., Lapoint, F.J., McMorris, F.R., Roberts, F.S., eds. *Bioconsensus*. Vol. 61 of *DI-MACS Series in Discrete Mathematics and Theoretical Computer Science*. American Mathematical Society. p. 135-60

- Cherian MG, Hursh JB, Clarkson TW, Allen J.** (1978). Radioactive mercury distribution in biological fluids and excretion in human subjects after inhalation of mercury vapor. *Arch Environ Health*. 33, 109–14.
- Cherki H, Berrouui A, Drissi A, Adlouni A.** (2006). Argan oil: Which benefits on cardiovascular diseases?. *Pharmacol Res*. 54, 1–5.
- Cherki M, Derouiche A, Drissi A, El Messal M, Bamou Y, Idrissi-Ouadghiri A, Khalil A and Adlouni A.** (2005). Consumption of argan oil may have an antiatherogenic effect by improving paraoxonase activities and antioxidant status: Intervention study in healthy men. *Nutr Metab Cardiovas*. 15 (5), 352-360.
- Chimi H.** (2005). Conservation comparés de l'huile d'argan et de l'huile d'olive. *Cahiers Agr*. 14(5), 467-471.
- Clarkson TW.** (2002). The three modern faces of mercury. *Environ Health Perspect*. 110(Suppl 1), 11–23.
- Communication de la Commission européenne**-Stratégie communautaire sur le mercure COM [2005]-20 du 28/01/2005 (JOCE du 2/03/05).
- Collier A et lemaire B.** (1974), Etude des caratenoïdes de l'huile d'argan. *Cah. Nutr. Diét. IX* (4), 300-301.
- Curtin J F, Donovan M, Cotter TG.** (2002). Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis. *J of Imm Methods*. 265, 49-72.
- D**
- Das KK, Dasgupta S.** (2000). Effect of nickel on testicular nucleic acid concentrations of rats on protein restriction. *Biol Trace Elem Res*. 73(2), 175-180.
- Das KK, Das SN.** (2004). Studies on the role of ascorbic acid on nickel induced hepatic nucleic acid concentration in rat. *Basic Clin Physiol Pharmacol*. 15, 185-195.
- De Bont B, Lauwerys R, Govaerts H, Moulin D.** (1986). Yellow mercuric oxide ointment and mercury intoxication. *Eur J Pediatr*. 145, 217–8.
- Deepmala J, Deepak M, Srivastav S, Sangeeta S, Kumar SA, Kumar SS.** (2013). Protective effect of combined therapy with dithiothreitol, zinc and selenium protects acute mercury induced oxidative injury in rats. *J Trace Elem Med Biol*. 27(3), 249-56.
- Delattre J.** (2005). Radicaux libres et stress oxydant ed : TECDOC. Londres-paris – new york. p :620.

- Derouiche A, Cherki M, Drissi A, Bamou Y, El Messal M, Idrissi-Oudghiri A.** (2005). Nutritional intervention study with argan oil in man: effects on lipids and apolipoproteins. *Ann Nutr Metab.* 49, 196–201.
- Diana XD.** (1988). Evaluation of tissue disposition, myelopoietic, and immunologic response in mice after long-term exposure to nickel sulfate in the drinking water. *Toxicol Environ Health.* 24(3), 357-72.
- Dinarello CA.** (1994). The interleukin-1 family: 10 years of discovery. *Faseb J.* 8, 1314-1325.
- Dinarello CA.** (1996). Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood.* 87, 2095-2147.
- Dinarello CA.** (2002). The IL-1 family and inflammatory diseases. *Clin Exp Rheumatol.* 20, S1-13.
- Drissi A, Girona J, Cherki M, et al.** Evidence of hypolipemiant and antioxidant properties of argan oil derived from the argan tree (*Argania spinosa*). (2004). *Clin Nutr.* 23, 1159–1166.
- Dubey C, Bellon B, Bruet P.** (1991). TH1 and TH2 dependent cytokines in experimental autoimmunity and immune reactions induced by chemicals. *Eur Cytokine Netw.* 2, 147-52.
- Dubois F, Belleville F.** (1988). Sélénium : rôle physiologique et intérêt en pathologie humaine. *Path Biol.* 36, 1017-1025.
- Dubois S, Breton M, Linder J, Fanni M.** (2007). Fatty acid profiles of 80 vegetable oils with regard to their nutritional potential. *Eur J Lipid Sci Technol.* 109, 710-732.
- Durackova Z, Djrolo F, Hougbe H, Avode G, Attoulou V, Addra B, Kodjoh N, Avimadj M.** (2008). Oxidants, Antioxidants and Oxidative stress. Mitochondrial medicine. Gvozdzakova A (ed) pp 19-43.
- £
- Ekor M, Adesanoye OA, Farombi EO.** (2010). N-acetylcysteine pretreatment ameliorates mercuric chloride-induced oxidative renal damage in rats. 39, 153-60.
- Emberger L.** (1960), Les végétaux vasculaires. *Masson Paris*, Tome II, 1540 p.
- Essig DA and Nosek TM.** (1997). Muscle fatigue and induction of stress protein genes: a dual function of reactive oxygen species. *Can J Appl Physiol.* 22, 409-428.
- Esterbauer H, Gebicki J, Puhl H, Jurgens G.** (1992). The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Rad Biol Med.* 13, 341 - 349.

**Esterbauer H, Striehl G, Puhl H, Rothe D.** (1989) Continuous monitoring of in vitro oxidation of human low density lipoprotein. *Free Radic Biol Med.* 6, 67-75.

¶

**Fabre B, Fort-lacoste L et Charveron M.** (1998). L'intérêt de l'huile d'argan vierge et enrichie en insaponifiable ainsi que les peptides extraits de tourteaux en cosmétologie. In : colloque international sur les ressources végétales l'arganier et les plantes des zones arides et semi-arides. agadir 23-25 Avril.

**Faraji H, Lindsay RC.** (2004). Characterization of the antioxidant activity of sugars and polyhydric alcohols in fish oil emulsion. *J Agric Food Chem.* 52, 7164-71.

**Faure PLJ.** (1995). Measurement of plasma sulfhydryl and carbonyl groups as a possible indicator of protein oxidation. . *Analysis of Free Radicals in Biological Systems.* 237-248.

**Favier A.** (2003). Le stress oxydant: Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. Mécanismes biochimiques. *L'act Chim.* 108-115.

**Favier A.** (1997). Le stress oxydant: intérêt de sa mise en évidence en biologie médicale et problèmes posés par le choix d'un marqueur. *Ann Biol Clin.* 55 (1), 9 - 16.

**Favier A.** (2003). Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'act Chim.* 108 - 115.

**Finch JM, Turner RJ.** (1996). Effects of selenium and vitamin E on the immune responses of domestic animals. *Res Vet Science.* 60, 97-106.

**Flohe L, Gunzler WA.** (1984). Analysis of glutathione peroxidase, *Methods Enzymol.* 105, 114–121. for Cadmium. Atlanta, GA; 1999 (accès 6 juin 2008).

**Foster JR.** (2001). The functions of cytokines and their uses in toxicology. *Int J Exp Pathol.* 82, 171-192.

**Fuhrman B, Lavy A, Aviram M.** (1995). consumption of red wine with meals reduces the susceptibility of human plasma and LDL to lipid peroxidation. *Am J clin nutr.* 61, 5549-54.

§

**Galan P, Preziosi P, Triol I.** (1997). Antioxydant et prevention cahiers de nutrition et de diététique. 359-370.

- Garg M C, Chaudhary D P, Bansal D D.** (2005). Effect of vitamin E supplementation on diabetes induced oxidative stress in experimental diabetes in rats. *Ind J of Exp Biol.* 43, 177-180.
- Garnier R. Mercure.** In: **Bismuth C et al.,** éd. Toxicologie Clinique. Paris Flammarion Médecine Science, 2000. p. 614-23.
- Garrel C, Ceballos-Picot I, Germain G, Al-Gubory K H.** (2007). Oxidative stress-inducible antioxidant adaptive response during prostaglandin F<sub>2</sub>α-induced luteal cell death in vivo. *Free Rad Res.* 41, 251-9.
- Georgé S, Brat P, Alter P, Amiot JM.** (2005). Rapid determination of polyphenols and vitamin C in plant-derived products. *J of Agr and Food Chem.* 53, 1370-1373.
- Gerster H.** (1993). Anticarcinogenic effect of common carotenoids. *Inter J for Vit and Nut Res.* 63, 93-121.
- Gharby S, Harhar H, Kartah B, EL-Monfalouti H, Haddad A, Charrouf Z.** (2011). Analyse chimique et sensorielle de l'huile d'argan. *Tech de Lab.* 6, 22.
- Gonzalez G.** (1997). Ibn al-Baytār et ses apports à la botanique et à la pharmacologie dans le Kitāb al-Ġāmī. Médiévales, 23-39.
- Gordon S.** (2003). Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol.* 3, 23-35.
- Graham TW.** (1991). Trace element deficiencies in cattle. *Vet Clin North Am.* 7, 153-197.
- Gruys E, Toussaint MJ, Niewold TA & Koopmans SJ.** (2005). Acute phase reaction and acute phase proteins. *J Zhejiang Univ Sci B.* 6, 1045-1056.
- Gupta S, Ahmad N, Husain MM, Srivastava RC.** (2000). Involvement of nitric oxide in nickel-induced hyperglycemia in rats. *Nit Ox.* 4, 129-138.
- Gurer H, Ozunes H, Neal R, Spitz DR, Ercal N.** (1998). Antioxidant effects of N-acetylcysteine and succimer in red blood cells from lead exposed rats. *Toxicol.* 120, 181-189.
- Gutteridge J.** (1992). Invited review free radicals in disease processes: a compilation of cause and consequence. *Free Rad Res Comm.* 19, 598-620.
- ƒf**
- Habig WH, Pabst Jakoby WB.** (1974). Glutathione-S-transferase the first step in mercapturic acid formation. *J Biol chem.* 249, 7130-9.
- Hidiroglou M, Batra TR, Roy GI.** (1994). Changes in plasma α-tocopherol and selenium of gestating cows fed hay or silage. *J Dairy Sci.* 77, 190-195.

- Haimeur A, Messaouri H, Ulmann L, Mimouni V, Masrar A, Chraïbi A, Tremblin G and Meskini N.** (2013). Argan oil prevents prothrombotic complications by lowering lipid levels and platelet aggregation, enhancing oxidative status in dyslipidemic patients from the area of Rabat (Morocco). *Lipid in Health and Dis.* 12, 107.
- Halliwel B et Gutteridge, JMC.** (2007). Free radicals in biology and medicine oxford university press. 20-31.
- Haufroid V, Hoet P, Lauwerys R, Lison D.** (2007). Mercure. In : Toxicologie industrielle et intoxication professionnelle. Paris : Elsevier Masson. p. 309-63
- Hilali M.** (2001). Contribution à la valorisation de l'arganier : étude des caractéristiques physico-chimiques de l'huile d'argan en fonction de son mode d'extraction et étude comparative des fruits de l'arganier en fonction de leurs formes et leurs régions DES, Faculté des sciences, université mohammed V, Maroc. 96P.
- Hilali M, Charrouf Z, Soulhi A A, Hachimi L, and Guillaume D.** (2005). Influence of origin and extraction method on argan oil physico-chemical characteristics and composition. *J Agric Food Chem* . 53, 2081-2087.
- Holzenberger M, Dupont J, Ducos B, Leneuve P, Geloën A, Even PC, Cervera P, Le bouc Y.** (2003). IGF-1 receptor regulates lifespan and resistance to oxidative stress in mice. *Nat.* 421(6919), 182-187.
- Horiguchi H, Sato M, Konno N, Fukushima M.** (1996). Long term cadmium exposure induces anaemia in rats through hypoinduction of erythropoietin in the kidney. *Arch Toxicol.* 71, 11-19.
- Houlot R.** (1984). Techniques d'histopathologie et de cytopathologie. Ed. Maloine 19-21, 225-227.
- Hua J, Pelletier L, Berlin M, Druet P.** (1993). Autoimmune glomerulonephritis induced by mercury vapour exposure in the Brown Norway rat. *Toxicol.* 79, 119-29.
- Huang TT, Carlson EJ, Kozy HM, Mantha S, Goodman SI, Ursell PC, Epstein CJ.** (2001). Genetic modification of prenatal lethality and dilated cardiomyopathy in Mn superoxide dismutase mutant mice. *Free Radic Biol Med.* 31, 1101-1110.
- Huang T, Kuersten S, Deshpande AM, Spieth J, MacMorris M, Blumenthal T.** (2001). Intercistronic region required for polycistronic pre-mRNA processing in *Caenorhabditis elegans*. *Mol Cell Biol.* 21, 1111-1120.
- Hughes MF, Pickering IJ, Prince RC, Younis HS, Winzerling JJ.** (2002). Arsenic toxicity and potential mechanism of action. *Chem Res Toxicol.* 15, 1466-1471.

**Hursh JB, Clarkson TW, Miles EF, Goldsmith LA.** (1989). Percutaneous absorption of mercury vapor by man. *Arch Environ Health.* 44, 120–7.

### *J*

**Ilback NG, Sundberg J, Oskarsson A.** (1991). Methyl mercury exposure via placenta and milk impairs natural killer (NK) cell function in newborn rats. *Toxicol lett.* 58, 149-58.

**INERIS** (Institut National d'Environnement industriel et de risques). (2010). données toxicologiques et environnementales des substances chimiques. Mercure et ses dérivés, France.

### *L*

**Jagota SK, Dani HM.** (1982) A new colorimetric technique for estimation of vitamine C using folin phenol reagent. *Anal Biochem.* 127(1), 178-182.

**Jean Jacques Melet (2000).** Toxicité du mercure. L'Espagne

**Jenkins AJ, Hill MA, Rowley KG.** (2007). Diabetes and Oxidant Stress. Atherosclerosis and Oxidant Stress. A New Perspective. Holtzman J.L (ed) pp123-160.

**Joshi D, Mittal D, Shrivastav S, Shukla S, Srivastav AK.** (2011). Combined effect of N acetyl cysteine, zinc, and selenium against chronic dimethylmercury-induced oxidative stress: a biochemical and histopathological approach. 61, 558-67.

**Joshi D, Mittal D K, Shukla S, Srivastava A K, Srivastava S K.** (2014). N-acetyl cysteine and selenium protects mercuric chloride-induced oxidative stress and antioxidant defense system in liver and kidney of rats: A histopathological approach. *J of Trace Elem in Med and Biol.* 28, 218–226.

**Ji LL, Fu R, Mitchell EW.** (1992) Glutathione and antioxidant enzymes in skeletal muscle: effects of fiber type and exercise intensity. *J Appl Physiol.* 73, 1854-1859.

### *K*

**Kagi JHR.** (1993). Evolution, structure and chemical activity of class 1 metallothioneins: an overview, in: Suzuki, KT, Imura, N, Kimura, M. (Eds), Metallothionein III: Biological roles and medical implications, Birkhauser verlag, Berlin.29-56.

**Kaplowitz NT, Okhtens M.** (1985). The regulation of the hepatic glutathione. *Ann Rev Pharmacol Toxicol.* 25, 715-744.

**Karleskind A.** (1992). Manuel des corps gras tome II, Ed. Tec et Doc. Paris, P1-1565.

- Karmakar R, Bhattacharya R, Chatterjee M.** (2000) Biochemical, haematological and histopathological study in relation to time-related cadmium-induced hepatotoxicity in mice. *Biomet.* 13, 231-239.
- Kazantzis GD, Nanos GG.** (2003). Effect of harvest time and storage conditions on almond kernel oil and sugar composition. *J Sci Food Agric.* 83, 354-359.
- Kehrer JP.** (1993). Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Crit Review in Toxicol.* 23 (1), 21-48.
- Kerper LE, Mokrzan EM, Clarkson TW, Ballatori N.** (1996). Methylmercury efflux from brain capillary endothelial cells is modulated by intracellular glutathione but not ATP. *Toxicol Appl Pharmacol.* 141, 526-31.
- Khallouki F, Younos C, Soulimani R.** (2003). Consumption of argan oil (Morocco) with its unique profile of fatty acids, tocopherols, Squalene, Sterols and phenolic compounds should confer valuable cancer chemopreventive effects. *Eur J Cancer Prev.* 12(1), 67-75.
- Khallouki, B. Spiegelhalder.** (2005) Secondary metabolites of argan tree (Morocco) may have disease prevention properties. *J. Biotechnol.* 4, 381-388.
- Kim SH, Johnson VJ, Sharma RP.** (2003). Oral exposure to inorganic mercury alters T lymphocyte phenotypes and cytokine expression in BALB/c mice. *Arch Toxicol.* 77, 613-20.
- Kim SH, Johnson VJ, Sharma RP.** (2002). Mercury inhibits nitric oxide production but activates proinflammatory cytokine expression in murine macrophage: differential modulation of NF-KappaB and P38 MAPK signaling pathways. *Nitric Oxide.* 7, 67-74.
- Klaassen C D, Liu J, Choudhuri S.** (1999). Metallothionein: an intracellular protein to protect against cadmium toxicity. Annual review of pharmacology and *Toxicol.* 39, 267-94.
- Koshino T, Arai Y, Miyamoto Y, Sano Y, Itami M.** (1996). Airway basophil and mast cell density in patients with bronchial asthma: relationship to bronchial hyperresponsiveness. *J Asthma.* 33, 89-95.
- Kostic MM, Ognjanovic B, Dimitrijevic S, Zikic RV, Stajnosic GL, Zivkovic RV.** (1993) Cadmium-induced changes of antioxidant and metabolic status in red blood cells of rats: *in vivo* effects. *Eur J Haematol.* 51, 86-92.
- Kumar V, Abul K A, Nelson F and Richard M.** (2007). *Robbins Basic Pathology*, 8th Edition, 20-60.

**Kweon MH, Hwang HJ, Sung HC.** (2001). Identification and antioxidant activity of novel chlorogenic acid derivatives from bamboo (*phyllostachys edulis*). *J agric food chem.* 49, 4646-55.

## **L**

**Lauwerys RR, Haufroid V, Hoet P, Lison D.** (2007) . Mercure. In: Toxicologie industrielle et intoxication professionnelle. Paris: Elsevier Masson. 309–63.

**Lazo JS, Pitt BR.** (1995). Mettalothionein and cell, death by anticancer drug. *Ann Rev Pharmacol Toxicol.* 35, 655-677.

**Lebreton P, Salat O, Nicot JM.** (1998). Un point sur le selenium. *Bulletin des GTV 5B.* 35-47.

**Lee KJ and Dabrowski K.** (2003). Interaction of vitamin C and E in yellow perch (*Perca flavescens*) nutrition and reproduction. *Br J Nutr.* Vol. 89, 589-596. activity of fourteen wild edible fruits from Burkina Faso. *Mol.* 13, 581-594.

**Lehucher-Michel MP, Lesgards JF, Delubac O, Stocker P, Durand P, Prost M.** (2001) Stress oxydant et pathologies humaines. *La Presse méd.* 30, 1076-1081.

**Levine RL.** (2002). Carbonyl modified proteins in cellular regulation; aging and disease. *Free Radic Biol Med.* 32, 790-796.

**Liao VH, Freedman JH.** (1998). Cadmium-regulated genes from the nematode *Caenorhabditis elegans*. Identification and cloning of new cadmium-responsive genes by differential display. *J Biol Chem.* 273, 31962-31970.

**Li Y, Huang TT, Carson EJ.** (1995). Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase. *Nat Genet.* 11, 376-381.

**Li HB, Cheng KW, Wong CC, Fan KW, Chen F, Jiang Y.** (2007) Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food chem.* 102, 771-776.

## **M**

**Ma J, Chen T, Mandelin J, Ceponis A, Miller NE, Hukkanen M, Ma GF & Konttinen YT.** (2003). Regulation of macrophage activation. *Cell Mol Life Sci.* 60, 2334-2346.

Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A & Locati M. (2004). The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* 25, 677-686.

- Marfil R, Cabrera-Vique C, Gimenez R, Bouzas PR, Martinez O and Sanchez JA.** (2008). Metal content and physicochemical parameters used as quality criteria in virgin argan oil: influence of the extraction method. *J Agric Food Chem.* 56, 7279-7284.
- Marnett LJ.** (1999). Lipid peroxidation-DNA damage by Malondialdehyde. *Mutat Res.* 424, 83-95.
- Marsella BA, Di Benedetto R, Vari R, Filesi C, Giovannini C.** (2005). Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione related enzymes. *Nutr Biochem.* 16, 577-586.
- Martelli A, Rousselet E, Dycke C, Bouron A, Moulis J M.** (2006). Cadmium toxicity in animal cells by interference with essential metals. *Biochimie.* 88, 1807-14.
- Masella R, Giovannini C, Vari R, Di benedetto R, Coni E, Volpe R.** (2002). effect of dietary virgin olive oil phenols on low density lipoprotein oxidation in hyperlipidemic patients lipids. 36, 1195-202.
- Matthäus B and Spener F.** (2008). What we know and what we should know about virgin oils a general introduction. *Eur J of Lipid Sci and Tech.* 110, 597-601.
- Martínez-Cayuela, M.** (1995) Oxygen free radicals and human disease. *Bioch.* 77, 147-161.
- Mekhfi H, Belmekki F, Ziyat A, Legssyer A, Bnouham M, Aziz M.** (2012). Antithrombotic activity of argan oil: An in vivo experimental study. *Nut.* 1-5.
- Milbury P E. et Richer A C.** (2008). Understanding the Antioxidant Controversy; Ed: PRAEGER; p: 81-100.
- Milton- Prabua S, Shagirthab K, Renugadevia,J.** (2011). Quercetin in combination with vitamins (C and E) improve oxidative stress and hepatic injury in cadmium intoxicated rats. *Biomed & Prev Nut.* 1, 1-7.
- Modi M, Kaul RK, Gurusamy M, Kannan GM, Flora SJS.** (2006). Coadministration of zinc and n-acetylcysteine prevents arsenic-induced tissue oxidative stress in male rats. *J of Trace Elem in Med and Biol.* 20, 197-204.
- Montagnier L, Olivier R, Pasquier C.** (1998). Oxidative stress in cancer. AIDS, and neurodegenerative diseases. *Free Radic Biol Med.* 22, 359-378.
- Mordret F.** (1971). Thèse d'Université, Eude DE l'Insaponifiable de l'Huile de Tournesol, Paris.
- N*
- Nair J, Barbin A, Velic I, Bartsch H.** (1999). Etheno DNA-base adducts from endogenous reactive species. *Mutat.* 424, 59-69.

- Nathan C.** (2002). Points of control in inflammation. *Nature*. 420, 846-852.
- Necib Y, Bahi A, Zerizer S.** (2013a). Argan oil (*Argania Spinosa .L*) provides protection against mercuric chloride induced oxidative stress in rat albinos wistar. *Int J of basic and App sci*. 2(1), 73-80.
- Necib Y, Bahi A, Zerizer S, Abdennour C, Boulakoud MS.** (2013i). Hepatoprotective role of sodium selenite against oxidative damage induced by mercuric chloride in rat albinos wistar. *J of stress physiol and biochem*. 9(4), 230-240.
- Necib Y, Bahi A, Zerizer S.** (2013c). Protective role of sodium selenite on mercuric chloride induced oxidative and renal stress in rats. *J of stress physiol and biochem*. 9(2), 160-172.
- Necib Y, Bahi A, Zerizer S, cherif A, Boulakoud MS.** (2013f). Effect of olive oil (*olea europea .L*) on kidney function impairment and oxidative stress induced by mercuric chloride in rats. *Am J of Biochem and Biotech*. 9 (4), 144-148.
- Necib Y, Bahi A, Zerizer S.** (2013h). Immunomodulatory Effect of Argan oil (*Argania spinosa. L*) After Exposure to Mercuric Chloride in Mice. *Int J Pharm Sci Rev Res*. 23(1), 191-193.
- Necib Y, Bahi A, Zerizer S, Abdennour C and Boulakoud MS.** (2013d). Immunomodulatory activity of Argan oil (*Argania Spinosa.L*). *Am J of Immuno*. 9 (3), 85-87.
- Nicolas JF, Florence C and Jean T.** (2001). Immunologie clinique et allergologie. Aspirine et AINS : intolérance et allergie. *John Libbey Eurotext*. 2001, 55-58.
- Nogueira CW, Soares FA, Naximento PC, Muller DA, Rocha JBT.** (2003a). 2,3-Dimercaptopropane -1-sulfonic acid and meso-2,3-dimercaptosuccinic acid increase mercury and dehydratase. *Toxicol* .184, 85-95.
- Nourshargh S, Fritz K, and Elisabetta D.** (2006). The role of JAM-A and PECAM-1 in modulating leukocyte infiltration in inflamed and ischemic tissues. *J of Leuk Biol*. 80, 714-718.
- 
- Olivieri G, Brack C, Muller-Spahn F, Stahelin HB, Herrmann M, Renard P** (2000). Mercury induces cell cytotoxicity and oxidative stress and increases beta-amyloid secretion and tau phosphorylation in SHSY5Y neuroblastoma cells. *J Neurochem*. 74 (1), 231-6.
- ℘
- Packer T, Ritschler HJ, Wessel K.** (1997). Neuroprotection by the metabolic antioxidant alpha-lipoic acid. *Free Radic Biol Med*. 22, 359-378.

- Paglia DE, Valentine WN.** (1967). Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med.* 70(1), 158-169.
- Paolisso G, Sgambato S, Pezza G, Passariello N, Varricchio M, D'Onof F.** (1989). Improved insulin response and action by chronic magnesium administration in aged NIDDM subjects. *Diabet Care.* 12, 265–269.
- Papp LV, Lu J, Holmgren A, Khanna KK.** (2007). From selenium to selenoproteins: synthesis, identity, and their role in human health. *Ant Red Signal.* 9(7), 775-806.
- Pari L, Parasath A.** (2008). Efficacy of caffeic acid in preventing nickel induced oxidative damage in liver of rats. *Biochem Biotech.* 173, 77-8.
- Peixoto NC, Pereira ME.** (2007). Effectiveness of ZnCl<sub>2</sub> in protecting against nephrotoxicity induced by HgCl<sub>2</sub> in newborn rats. 66, 441-6.
- Pellegrini N, Serafini M, Colombi B, Del Rio D, Salvatore S, Bianchi M and Brighenti F.** (2003). Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different in vitro assays. *J Nutr.* 133, 2812-2819
- Perottoni J, Rodrigues OED, Paixao MW, Zeni G, Labato LP, Braga AL, Rocha JBT, Emanuelli T.** (2004b). Renal and hepatic ALA-D activity and selected oxidative stress parameters of rats exposed to inorganic mercury and organoselenium compounds. *Food Chem Toxicol.* 42, 17-28.
- Perrin JL.** (1992). Manuel des Corps Gras, tome 2. Ed. Tekhnique et documentation Lavoisier, Paris.
- Petrovic S, Ozretic B, Krajnovic-Ozretic M, Bobinac D.** (2001). Lysosomal membranestabilityandmetallothioneinsindigestiveglandofmussels (*Mytilus galloprovincialis* Lam.) asbiomarkersinafieldstudy. *Mar Pollut Bull.* 42, 1373–1378.
- Picot A, Proust N.** (1998). Mercury And Its Compounds: from speciation to toxicity. *Act Chim.* 4, 16-24.
- Pincemail J, Meurisse M, Limet R, Defraigne JO.** (1999). L'évaluation du stress oxydatif d'un individu : une réalité pour le médecin. *Vaiss Cœur Poumons.* 4(5), 359-370.
- Piquet M A. et Hébuterne X.** (2007). Nutrition en pathologie digestive ; Ed : DOIN ; p: 16-20.
- PNUE (Programme des Nations Unies pour l'Environnement).** (2002). L'évaluation mondiale du mercure.
- Porcheray F, Viaud S, Rimaniol AC, Leone C, Samah B, Dereuddre-Bosquet N, Dormont D & Gras G.** (2005). Macrophage activation switching: an asset for the resolution of inflammation. *Clin Exp Immunol.* 142, 481-489.

- Powers SK , Lennon SL.** (1999) Analysis of cellular responses to free radicals: focus on exercise and skeletal muscle. *Proc Nutr Soc.* 58, 1025-1033.
- Prakash D, Upadhyay G, Brahma N, Singh HB.** (2007). Singh antioxidant and free radical scavenging activities of seeds and agri-wastes of some varieties of soybean (*Glycine max*). *Food Chemistry.* 104, 783-790.
- Prior RL, Cao G.** (1999). In vivo total antioxidant capacity: comparaison of dfferent analytical methods. *Free radic Biol Med.* 27, (11-12): 1173-1181.
- Puntarulo S.** (2005). Iron, oxidative stress and human health. *Mol Aspects Med.* 26, 299-312.
- Q**
- Quezel P, Santa S.** (1962). Nouvelle flore de l'algérie et régions désertiques méridionales Tome 2. Centre national de la recherche, Paris, 565P .
- R**
- Radi N.** (2003). L'arganier: arbre du sud-ouest marocain, en péril, à protéger, thèse Univ. Grenoble 3 novembre
- Rao MV, Purohit A, Patel T** (2010). Melatonin protection on mercury-intoxicated brain toxicity in the rat. 33, 209-16
- Rahmani M.** (2005). Composition chimique de l'huile d'argan vierge. *Cahiers Agr.* 14(5), 461-465.
- Rajagopal K, Sasikala K.** (2008). Antihyperglycaemic and antihyperlipidaemic effects of *Nymphaea stellata* in alloxan-induced diabetic rats. *Singapore Med J.* 49 (2), 137 - 142.
- Ramadan MF, Kroh LW, Mörsel JT.** (2003) Radical scavenging activity of black cumin (*Nigella sativa* L.), coriander (*Coriandrum sativum* L.), and niger (*Guizotia abyssinica* Cass.) crude seeds oils and oil fractions. *J of Agr and food chem.* 51, 6961-6969.
- Rana SV, Rekha S, Seema V.** (1996). Protective effects of few antioxidants on liver function in rats treated with cadmium and mercury. *Ind J of Exp Biol.* 34, 177–179.
- Rayssiguer Y, Noe L, Etienne J.** (1991). Effect of magnesium deficiency on post-heparin lipase activity and tissue lipoprotein lipase in the rat. *Lipid.* 26, 182–186.
- Richard M J, Portal B, Meo J, Coudray C, Hadjian A and Favier A.** (1992). "Malondialdehyde kit evaluated for determining plasma and lipoprotein fractions that react with thiobarbituric acid." *Clin Chem.* 38(5), 704-9.
- Roja L, quideau S, Pardon P, Charrouf Z.** (2005). Colorimetric evaluatin of phenolic content and GC-MS characterized of phenolic composition of aalimentary and cosmetic argan oil and press cake. *J Agri Food Chem.* 53, 9122-7.

- Ruminy P, Gangneux C, Claeysens S, Scotte M, Daveau M & Salier JP.** (2001). Gene transcription in hepatocytes during the acute phase of a systemic inflammation: from transcription factors to target genes. *Inflamm Res.* 50, 383-390.
- Russo-Marie F, Peltier A, Polla B.** (1998). L'Inflammation. *John Libbey Eurotext, Paris.*
- Russell DG. (2007). Who puts the tubercle in tuberculosis?. *Nat Rev Microbiol.* 5, 39-47.
- Rutkowski M, K Grzegorzcyk.** (2007). Modifications of spectrophotometric methods for antioxydative vitamins determination convenient in analytic practice. *Acta Sci Pol Technol Aliment.* 6(3), 17-28.
- §
- Samane S, Christon R, Dombrowski L, Turcotte S, Charrouf Z, Lavigne C, Levy E, Bachelard H, Amarouch H, Marette A.** (2009). Fish oil and argan oil intake differently modulate insulin resistance and glucose intolerance in a rat model of dietary-induced obesity. *Meta: Clin and Exp.* 58, 909-919.
- Samane S, Noel J, Charrouf Z, Amarouch H and Haddad PS.** (2006). Insulinsensitizing and anti-proliferative effects of *Argania spinosa* seed extracts. *Evid Based Complement Alternat Med.* 3, 317-327.
- Sanchez-Moreno C.** (2002) Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Int J of Food Sci and Tech.* 8, 121-137.
- Santarelli L, Bracci M, Mocchegiani E.** (2006). In vitro and in vivo effects of mercuric chloride on thymic endocrine activity, NK and NKT cell cytotoxicity, cytokine profiles (IL1- IFN- $\gamma$ , IL6): role of the nitric oxide-L-arginine pathway. *Int immunopharmacol.* 376-389.
- Sarkhail P, Rahmanipour S, Fadyevatan S, Mohammadirad A, Dehghan G, Amin G, Shafiee A, Abdollahi M.** (2007). Antidiabetic effect of *Phlomis anisodonta*: Effects on hepatic cells lipid peroxidation and antioxidant enzymes in experimental diabetes. *Pharmacol Res.* 56, 261 - 266.
- Satsangi K, Dua KK.** (2000). Protective effect of few dietary nutrients against aluminium toxicity in mice. In international conference on probing in biological systems. *Mumbai India Abste.* N71, P.186.
- Sedlak J, Lindsay RH.** (1968). Estimation of total protein bound and non protein sulphhydryl groups in tissues with Ellman's reagent. *Anal Biochem.* 25, 192-205.

- Sen CK.** (2001). Antioxidant and redox regulation of cellular signaling: Introduction. *Med Sci Sports Exer.* 33 (3), 368-370.
- Shimizu M, Kobayashi Y, Suzuki M, Satsu H, Miyamoto Y.** (2000). Regulation of intestinal glucose transport by tea catechins. *Biofactors.* 13, 61 - 65.
- Sidhu P, Garg ML, Dhawan DK.** (2004b). role of zinc in regulating the levels of hepatic elements following nickel toxicity in rats. *Biol Trace Elem Res.* 102, 161-172.
- Sies H.** (1993). Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Amer J of Med.* 91, 31S-38S.
- Simons JE, Yang RSH and Berman E.** (1995). Evaluation of the nephrotoxicity of complex mixtures containing organic metals: advantages and disadvantages of the use of real-world complex mixtures. *Environ Health Perspect.* 103, 67-71.
- Simonian N A, Coyle JT.** (1996). Oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Ann review of Pharmacol and Toxicol.* 36, 83-106.
- Singh U, Devaraj S and Jialal I.** (2005). Vitamine E, Oxidative stress, and inflammation. *Ann Rev of Nut.* 25, 151-175.
- Sohal RS, Mockett RJ, Orr WC.** (2002). Mechanisms of aging: an appraisal of the oxidative stress hypothesis. *Free Rad Biol Med.* 33 (5), 575-586.
- Song Y, Manson JE, Buring JE, Liu S.** (2004). Dietary magnesium intake in relation to plasma insulin levels and risk of type 2 diabetes in women *Diabetes Care.* 27, 59-65.
- Sola R, Motta C, Maille M.** (1993). Dietary monounsaturated fatty acids enhance cholesterol efflux from human fibroblasts, relation to fluidity, phospholipid fatty acid composition, overall composition, and size of HDL3. *Arterioscler thromb.* 13, 958-66.
- Sorg O.** (2004). Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality. *Comptes Rendu Biol.* 327, 649-662.
- Sour S, Belarbi M, Khaldi D, Benmansour N, Sari N, Nani A, Chemat F, Visioli F.** (2012). Argan oil improves surrogate markers of CVD in humans. *Brit J of Nut.* 107, 1800-1805.
- Stevnsner T, Tharslund T, De souza-pinto NC, Bohr VA.** (2002). Mitochondrial repair of 8-oxoguanine and changes with aging. *Exp Gerontol.* 37, 1189-1196.
- Stout RD & Suttles J.** (2004). Functional plasticity of macrophages: reversible adaptation to changing microenvironments. *J Leukoc Biol.* 76, 509-513.
- Sundberg J, Ersson B, Lönnerdal B, Oskarsson A.** (1991). Protein binding of mercury in milk and plasma from mice and man--a comparison between methylmercury and inorganic mercury. *Toxicol.* 137, 169-84.

**Spallholz JE, Boylan LM, Larsen HS.** (1990). Advances in understanding selenium role in the immune system. *Ann NY Acad Sci.* 587, 123-139.

### *J*

**Tastekin D, Atasever M, Adigüzel G, Keles M , Tastekin A** (2006). Hypoglycaemic effect of *Artemisia herba-alba* in experimental hyperglycaemic rats. *Bull Vet Inst Pulawy*, 50, 235-238.

**Testud F.** (2005). Mercure. In: Pathologie toxique professionnelle et environnementale. Paris: Eska. 239–51.

**Thevenod F.** (2003). Nephrotoxicity and the proximal tubule. Insights from cadmium. *Nephron Physiol.* 93, 87-93.

**Thomson G, Robinson M.** (1986). University and fecal excretion and absorption of large supplement of selenium superiority of selenate over selenite. *J Clin Nut.* 44, 659-663.

**Tracey D, Klareskog L, Sasso EH, Salfeld JG & Tak PP.** (2008). Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: a comprehensive review. *Pharmacol Ther.* 117, 244-279.

**Tracey KJ & Cerami A.** (1993). Tumor necrosis factor, other cytokines and disease. *Annu Rev Cell Biol.* 9, 317-343.

### *U*

**Upreti KK, Das M, Kuman A, Singh GB, Khanna SK.** (1989). Biochemical toxicology of argemone oil. IV: Short-term oral feeding response in rats. *Toxicol.* 58, 285-9.

**Underwood EJ, Suttle NF.** (2004). The mineral nutrition of livestock. 3rd éd. Cambridge: CABI publishing. 614.

### *V*

**Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M.** (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemicobiol inter.* 160, 1-40.

**Vane J R.** (1971). Inhibition of Prostaglandin Synthesis as a Mechanism of Action for Aspirinlike Drugs. *Nat New Biol.* 231, 232-235.

**Vertuani S, Angusti A, Manfredini S.** (2004). The antioxidants and pro-oxidants network: an overview. *Curr Pharm Des.* Vol 10, 1677-1694.

**Viala A.** (1998). Element de toxicology. Paris; Edition Médicale International.

**Viala A, Botta A.** (2005). Toxicologie. 2<sup>ème</sup> Edition, Paris.

**Viarengo A, Ponzano E, Dondero F, Fabbari R.** (1997). A simple spectrophotometric method for metallothionein evaluation in marine organisms: an application to Mediterranean and Antarctic molluscs. *Mar Environ Res.* 44, 69-84.

**Viarengo A, Burlando B, Ceratto N, Panifili I.** (2000). Antioxidant role of metallothioneins: a comparative overview. *Cell Mol Biol.* 46, 407-417.

W<sup>o</sup>

**Waisberg M, Joseph P, Hale B, Beyersmann D.** (2003). Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis. *Toxicol.* 192, 95-117

**Weckbeker G, Cory JG.** (1988). Ribonucleotide reductase activity and growth of Glutathione-depleted mouse leukemia L1210 cells in vitro. *Cancer Let.* 40, 257-264.

**Weill B, Batteux F and Dhainaut J.** (2003). Immunopathologie et réactions inflammatoires. Eds, De Boeck Université (Paris), 12-23.

**Welch WJ.** (1992). Mammalian stress response: cell physiology, structure/function of stress proteins, and implications for medicine and disease. *Physiol Rev.* 72, 1063-1081.

**Whitin JC, Bhamre S, Tham DM, Cohen HJ.** (2002). Extracellular glutathione peroxidase is secreted basolaterally by human renal proximal tubule cells. *Am J Physiol Renal Physiol.* 281, 20-28.

X

**Xia L, Nordman T, Olsson JM, Damdimopoulos A, Bjorkhembergman L, Nalvarte T, Eriksson LC, Armer ESJ, Spyron G, Bjornstedt M.** (2003). The mammalian selenoenzyme thioredoxin reductase reduces ubiquinone. A novel mechanism for defense against oxidative stress. *J Biol Chem.* 278, 2141-2146.

Y

**Yonda S, Suzuki KT.** (1997). Detoxification of mercury by selenium by binding of equimolar Hg-Se complex to a specific plasma protein. *Toxicol Appl Pharmacol.* 143, 274-280.

**Yousfi M, Bombarda B, Hamia C, Djeridane A, Stocker P, Gaydou E.** (2009). Fatty acid, Triglyceride and Tocopherol composition of Algerian Argan (*Argania Spinosa*) fruit seed lipids. *Mediterr J Nutr Metab.* 2, 197-203.

**Youshida M, Saegusa Y, Fukuda A, Akama Y, Owada S.** (2005). Measurement of radical scavenging ability in hepatic metallothionein of rat using in vivo electron spin resonance spectroscopy. *Toxicol.* 213, 74-80.

**Yue KD, McLennan S, McGill E, Fisher E, Hefferman C C and Turtle JR.** (1990). Abnormalities of ascorbic acid metabolism and diabetic control : differences between diabetic patients and diabetic rats. *Diabetics Res Clin Pract.* 9(3), 239-44.

## **Z**

**Zelko IN, Marian TJ, Folz RJ.** (2002). Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Rad Biol & Med.* 33, 337-349.



**Annexe01 : Les Methode de dosage des tests phytochimiques****1. Matériels et méthodes des tests phytochimiques****1.1. Les Caractéristiques physico-chimiques**

- **Indice d'acide (I.A) et acidité**

La détermination de l'indice d'acide est réalisée en utilisant la norme (AFNOR NFT60-204). Une quantité de masse bien précise d'huile est solubilisée dans 10 ml de chloroforme. La solution organique est ensuite dosée par une solution éthanolique d'hydroxyde de potassium 0.1N jusqu'au virage de l'indicateur coloré utilisé. L'indice d'acide est calculé par la relation suivante :

$$IA = \frac{56.11 \times T \times V}{m}$$

**T** : normalité de ml de la solution de KOH

**V** : volume de la solution éthanolique de KOH exprimé en ml

**m** : masse de la prise d'essai d'huile en gramme

**56,1** : masse molaire de KOH

Quant à l'acidité, elle exprime le pourcentage d'acides gras libres contenus dans un corps gras. Selon la nature du corps gras, l'acidité peut être exprimée en pourcentage d'acide oleique, palmitique, érucique ou laurique selon la relation suivante :

$$A\% = \frac{AI}{2}$$

- **Indice de saponification (I.S)**

La détermination de l'indice de saponification est réalisée en utilisant la norme (AFNOR. NF T60- 206) en suivant les étapes suivantes :

Une quantité d'un gramme d'huile est saponifiée à reflux par 25 ml de KOH éthanolique (0.5N) pendant une heure. L'excès du KOH est neutralisé par de l'acide hydrochlorique (HCl) (0.5N) en présence de phénophtaléine comme indicateur coloré. Un essai à blanc est réalisé dans les mêmes conditions sans l'huile. L'indice de saponification est calculé par la relation suivante:

$$IS = \frac{56.11 \times T(V_0 - V_1)}{m}$$

**V<sub>0</sub>** : volume de thiosulfate de sodium dans le test à blanc exprimé en ml

**V<sub>1</sub>** : volume de thiosulfate de sodium nécessaire pour la neutralisation de l'excès d'iode exprimé en ml

**T** : normalité de la solution de thiosulfate de sodium utilisée 0.1N.

**m** : masse prise d'essai d'huile en gramme

**56,1** : masse molaire de KOH

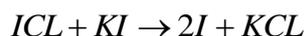
- **Indice d'iode (I.I)**

La norme (AFNOR NFT 60-203) est utilisée pour la détermination d'I.I en suivant le mode opératoire : Une quantité de 0.2g d'huile est solubilisée dans 20 ml dans de CCl<sub>4</sub>. A cette solution on ajoute 20ml de réactif de Wijis (solution de concentration de 0,1M de monochlorure d'iode (ICl)). Le mélange est bouché et mis à l'obscurité pendant 1 heure. On ajoute au mélange précédent 20ml d'une solution de 10 % m/v d'iodure de potassium (KI) et 100ml d'eau distillée puis on dose l'excès d'iode par une solution de thiosulfate de sodium Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (0.2N) en utilisant l'amidon comme indicateur.

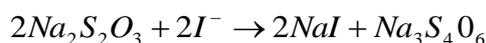
La réaction de dosage est la suivante :



Après le temps de réaction, l'excès d'iode est réduit par une solution aqueuse d'iodure de potassium selon la réaction suivante



L'iode libéré est alors titré par une solution de thiosulfate de sodium à 0.1N



L'indice d'iode est donné par la relation suivante :

$$IS = \frac{12.69 \times T(V_0 - V_1)}{m}$$

**V<sub>0</sub>** : volume de thiosulfate de sodium dans le test à blanc exprimé en ml

**V** : volume de thiosulfate de sodium nécessaire pour la neutralisation de l'excès d'iode exprimé en ml

**T** : normalité de la solution de thiosulfate de sodium utilisée 0.1N.

**m** : masse prise d'essai d'huile en gramme

- **Indice de peroxyde**

Le principe de la manipulation repose sur la mise d'une prise d'essai en solution dans un mélange d'acide acétique et de chloroforme avec addition d'une solution de KI. Après 5min à l'obscurité, l'iode libéré est titré par une solution de thiosulfate de sodium (0.002N) en présence d'empois d'amidon comme indicateur. Parallèlement à cela, on effectue un essai à blanc. La méthode utilisée est celle décrite par la norme ISO 3960. Les résultats sont exprimés par la relation suivante :

$$IP = \frac{T(V_0 - V_1)}{m} \times 100 (\text{méqd}'O_2 / \text{kg corps gras})$$

**V0** : volume de thiosulfate de sodium dans le test à blanc exprimé en ml

**V1** : volume de thiosulfate de sodium dans le test à échantillon exprimé en ml

**T** : normalité de la solution de thiosulfate de sodium utilisée 0.002N.

**m** : masse prise d'essai d'huile en gramme

- **Dosage des composés phénoliques de l'huile d'argan**

Le principe de dosage est basé sur la réduction en milieu alcalin de la mixture phosphotungstique ( $\text{WO}_4^{2-}$ ) phosphomolybdique ( $\text{MoO}_4^{2-}$ ) de réactif de Folin par les groupements oxydables des composés phénoliques, conduisant à la formation de produits de réduction de couleur bleue. Ces derniers présentent un maximum d'absorption à 765 nm dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans l'échantillon (Georgé et al., 2005). Brièvement, 1 ml de réactif de Folin (10 fois dilué) est ajouté à 200  $\mu\text{l}$  d'échantillon ou standard (préparés dans le méthanol) avec des dilutions convenables, Après 4 min, 800  $\mu\text{l}$  d'une solution de carbonate de sodium (75 mg/ml) sont additionnés au milieu réactionnel. Après 2 h d'incubation à l'obscurité à température ambiante l'absorbance est mesurée à 765nm.

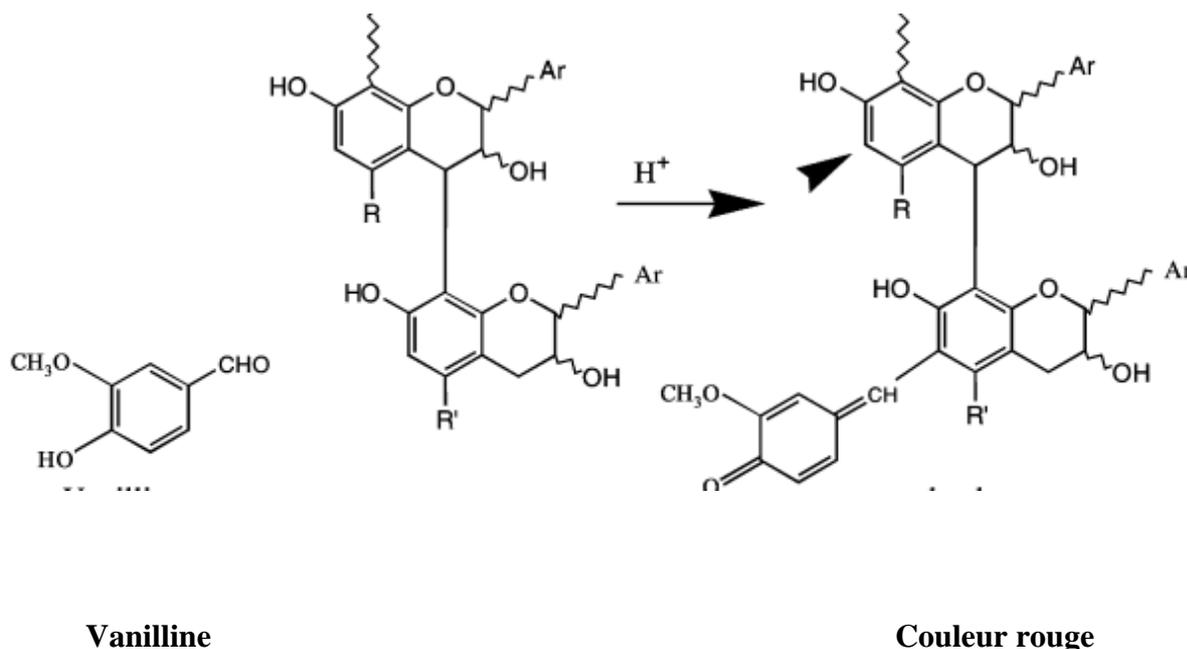
La concentration des polyphénols totaux est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage établie avec l'acide gallique (0-160  $\mu\text{g/ml}$ ) et est exprimée en  $\mu\text{g}$  d'équivalent d'acide gallique par milligramme d'extrait ( $\mu\text{g}$  EAG/mg d'extrait).

- **Dosage des flavonoïdes de l'huile d'argan**

1 ml de chaque échantillon et du standard avec dilutions convenables sont ajoutés à 1 ml d' $\text{AlCl}_3$  (2 % dans le méthanol). Après 10 min d'incubation, l'absorbance est lue à 430 nm. Les concentrations des flavonoïdes sont déduites à partir des gammes d'étalonnage établies avec la quercétine (0-35 $\mu\text{g/ml}$ ), et sont exprimées en microgramme d'équivalent de quercétine par milligramme de l'huile ( $\mu\text{g}$  EQ/mg).

- **Dosage des tanins condensés de l'huile d'argan**

Le principe de ce dosage est basé sur la fixation du groupement aldéhydique de vanilline sur le carbone 6 du cycle A de la catéchine pour former un complexe chromophore rouge qui absorbe à 500nm (Schofield et al .,2001) (Figure 39).



**Figure39** : La réaction entre la vanilline est les tanins condensés (Schofield et al ., 2001).-

Pour 400µl de chaque échantillon ou standard, on ajoute 3ml d'une solution de vanilline (4% dans le méthanol), et 1,5 ml d'acide hydrochlorique concentré. Le mélange est incubé durant 15 min et l'absorbance est lue à 500nm. Les concentrations des tanins condensés sont déduites à partir des gammes d'étalonnage établies avec la catéchine (0-300µg/ml), et sont exprimées en microgramme d'équivalent catéchine par milligramme d'extrait (µg E CT/mg).

- **Effet scavenger du radical DPPH in vitro**

La procedure experimentale est basé sur les étapes suivantes :

- ✚ Prélever 50µl de plasma
- ✚ Ajouter 1.95ml de DPPH

Laisser le mélange a l'obscurité pendant 30min, la décoloration par rapport au contrôle négatif contenant uniquement la solution de DPPH.

- ✚ Lire l'absorbance à une longueur d'onde : 517nm.

L'activité antiradicalaire est estimée selon l'équation suivante :

$$\% \text{ d'activité antiradicalaire} = \frac{A_{\text{blanc}} - A_{\text{échat}}}{A_{\text{blanc}}} \times 100$$

## Annexe 02 : Méthode de dosage des tests biologiques

### 2. Matériels et méthodes des tests biologiques

#### 2.1. Oxydation in vitro des lipoprotéines et dosage des diènes conjugués

Les diènes sont considérés comme les produits primaires de l'oxydation lipidique et présentent une absorption dans l'ultraviolet à 234 nm. L'addition de CuSO<sub>4</sub> (100µM) au plasma provoque l'oxydation des lipoprotéines plasmatiques qui se traduit in vitro par l'augmentation progressive de la densité optique à 234 nm, après une phase de latence. Cette augmentation de l'absorbance marque la formation de plus en plus importante des diènes conjugués dont la concentration est estimée en utilisant le coefficient d'extinction  $\epsilon = 29,50 \text{ mmol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$ , à 234 nm. Les variations de l'absorbance des diènes conjugués en fonction du temps permettent de tracer la courbe cinétique où trois phases consécutives sont déterminées : phase de latence, phase de propagation et phase de décomposition. A partir de cette courbe cinétique, plusieurs marqueurs de l'oxydation in vitro des lipoprotéines plasmatiques sont déterminés :

- ✚ T (lag) min correspond à la durée de phase de latence et marque le début de l'augmentation de la densité optique par rapport à la valeur initiale. Le T (lag) permet d'estimer la résistance des lipoprotéines à l'oxydation in vitro.
- ✚ Teneur initiale des diènes conjugués (µmol/l)
- ✚ Teneur maximale des diènes conjugués (µmol/l)
- ✚ T (max) min correspond au temps nécessaire pour obtenir l'oxydation maximale. Il marque la fin de la phase de propagation et le début de la phase de décomposition. Il se calcule sur la courbe cinétique en projetant la valeur de densité optique maximale sur l'axe des X (temps exprimé en minutes).
- ✚ Taux d'oxydation: représente la quantité de diènes conjugués formés par unité de temps. Il se calcule par (Taux maximum des diènes conjugués-Taux initial)/T (max)-T (Lag). Il est exprimé en µmol/L/min.

## 2.2. Dosage des paramètres immunologiques

- **Dosage des cytokines pro-inflammatoire (IL1, IL6 et TNF $\alpha$ )**

La procédure expérimentale du dosage est la suivante :

- ✚ Mettez 0.1 ml de chaque puit de 300Pg/ml, 150Pg/ml, 75Pg/ml, 37.5Pg/ml, 18.75Pg/ml, 9.38Pg/ml, 4.69Pg/ml de la solution de standard (IL1, IL6 et TNF $\alpha$ ) dans la plaque de 96 puit.
- ✚ Ajouter 0.1ml de tampon (dilution d'échantillons) dans le puits de control.
- ✚ Ajouter 0.1 ml de serum dans les puits
- ✚ Couvrir la plaque ensuite incuber à 37°c pendant 9 min
- ✚ Ajouter 0.1ml de biotinyle anti-human IL6 anticorps de la solution de travail dans les puits ensuite incuber la plaque à 37°c pendant 60 min
- ✚ Rincer la plaque 3cycles avec PBS (0.01M, PH=7.2-7.6)
- ✚ Mettez la plaque sur papier absorbent
- ✚ Ajouter 0.1ml de ABC solution de travail dans chaque puits, puis incuber à 37°c pendant 30min.
- ✚ Rincer la plaque 5cycle avec PBS
- ✚ Ajouter 90 $\mu$ l TMB (l'agent de developement de la couleur) dans chaque puits puis incuber à 37°c à l'obscurité de la lumière pendant 20 à 25min
- ✚ Ajouter 0.1ml THB (solution d'arrêter) dans chaque puits, la couleur est changé vers le jaune immédiatement.

Lire l'absorbance à 450nm dans la microplaque de la lecteur pendant 30 min après l'addition de la solution d'arrêter.

- **Dosage de l'activité phagocytaire**

L'activité phagocytaire est calculée d'après les formules de Biozzi *et al* (1970) :

$$K = \frac{\ln OD_1 - \ln OD_2}{t_2 - t_1}$$

$$t_{1/2} = \frac{0.693}{K}$$

### 2.3. Dosage de Malondialdéhyde (MDA) plasmatique

Le dosage est basé sur les étapes suivantes :

- ✚ Prélever 100µl de plasma
- ✚ Ajouter 750µl d'une solution contenant du TBA (0.55mM) et de l'acide perchlorique 7%
- ✚ Mélanger et ensuite placé pendant une heure au bain marie à 95°C.
- ✚ Ajouter 2ml de butanol pendant 2minutes sous agitation
- ✚ Centrifuger à 3500rpm pendant 10min à 4°C.
- ✚ Lire l'absorbance à une longueur d'onde 532nm

La concentration de MDA peut être calculée à partir d'une courbe d'étalonnage de 1.1.3.3tétraethoxypropane.

### 2.4. Evaluation de la capacité antioxydante plasmatique

- **Dosage de la vitamine C**

Après précipitation des protéines plasmatiques par l'acide trichloroacétique (10%) et centrifugation, le réactif de Folin est ajouté au surnageant. La vitamine C présente dans le surnageant réduit le réactif de Folin donnant une coloration jaune. L'intensité de la coloration obtenue est proportionnelle à la concentration en vitamine C à une longueur d'onde de 769 nm présente dans l'échantillon. La concentration est déterminée à partir de courbe étalon obtenu grâce à une solution d'acide ascorbique.

- **Dosage de la vitamine E**

La procédure expérimentale de dosage de la vitamine E est basée sur les étapes suivantes :

- ✚ Prelever 0.5ml de plasma ou homogénat
- ✚ Ajouter 0.5ml éthanol anhydrous
- ✚ Mélanger et laisser pendant 1minute
- ✚ Ajouter 3ml xylène et laisser 1min

- + Centrifuger à 1500g pendant 10min
- + Ajouter 0.25 ml de (batophénanthroline, FeCl<sub>3</sub> et de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>)
- + Mélanger bien et lire l'absorbance à une longueur d'onde : 539 nm

La concentration de la vitamine E peut être calculée selon l'équation suivante :

$$C_x = \frac{A_x}{A_s} \times C_s$$

**C<sub>s</sub>** : concentration de standard

**A<sub>x</sub>** : l'absorbance de standard

**A<sub>s</sub>** : l'absorbance de l'échantillon

- **Dosage des thiols plasmatique**

20µl de plasma étaient dilués dans du tampon phosphate et mis en présence de DTNB 2.5Mm. Après agitation, les échantillons étaient conservés à l'obscurité pendant 15min avant la mesure par spectrophotomètre dur 3min. une courbe de calibration était préparée à partir d'une solution de N-acétylcystéine (NAC) avec des concentrations allant de 0.125 à 0.6Mm .Les résultats étaient exprimés en µmol/mg de protéines.

- **Dosage de radical DPPH in vivo**

Brièvement, un volume de 50 µL de plasma est additionné à 950 µl de la solution méthanolique de DPPH (2,4 mg/100 ml de méthanol). Après 30 min d'incubation à l'obscurité suivie d'une centrifugation (Janaszewska et Bartosz, 2002), l'absorbance à 517 est mesurée. Le pouvoir antioxydant plasmatique est ensuite calculé.

## 2.5. Dosage de quelques paramètres du stress oxydant tissulaire et érythrocytaires

- **Dosage du glutathion**

Le principe de ce dosage repose sur la mesure de l'absorbance optique de l'acide 2-nitro-5-marcapturique qui résulte de la réduction de l'acide 5,5-dithio-bis-2-nitrobenzoïque par les groupements (-SH) du glutathion.

La procédure expérimentale du dosage du glutathion est la suivante :

- ✚ Prélever 0.8 ml de l'homogénat
- ✚ 0.2ml de la solution d'acide salicylique (0.25%)
- ✚ Agiter et laisser pendant 15 minutes dans un bain de glace
- ✚ Centrifuger a 1000 tours /min pendant 5min
- ✚ Prélever 0.5ml du surnageant
- ✚ Ajouter 1 ml du tampon Tris-NaCl, pH 7.4
- ✚ Mélanger et ajouter 0.025 ml de l'acide 5,5dithio-bis-2-nitrobenzoïque (DTNB) à 0.01M

Laisser pendant 5min à une température ambiante et lire les densités optiques à 412 nm contre le blanc réactif

La concentration du GSH est obtenue par la formule suivante :

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

**DO** : La densité optique.

**1** : Volume total des solutions utilisées de la déprotéinisation (0.8ml homogénat, 0.2ml SSA).

**1.525** : volume total des solutions utilisées dans le dosage du GSH au niveau du surnageant (0.5 ml surnageant + 1ml tris + 0.025 ml DNTB).

**13100** : Coefficient d'absorbance (concernant le groupement -SH à 412 nm).

**0.8** : Volume de l'homogénat après déprotéinisation.

**0.5** : Volume de surnageant trouvé dans 1.525 ml.

### ➤ Dosage de Malondialdéhyde (MDA)

Le principe de ce dosage est basé sur la condensation de MDA en milieu acide et à chaud avec l'acide thiobarbiturique, pour former un pigment (rose). Ce chromogène peut être donc mesuré par spectrophotométrie d'absorption à 530 nm.

La procédure expérimentale du dosage, est la suivante :

- ✚ Prélever 375µl de l'homogénat (surnageant)
- ✚ Ajouter 150µl de la solution tampon phosphate (0.1M, PH=7.8)
- ✚ Ajouter 375µl de la solution TCA-BHT(TCA20%,BHT1%)
- ✚ Vortexer et centrifuger à 1000 tours/min pendant 10min
- ✚ Prélever 400µl du surnageant
- ✚ Ajouter 80µl du Hcl 0.6M
- ✚ Ajouter 320µl de la solution tris-TBA(tris 26mM, TBA 120mM)

Mélanger et incuber au bain marie à une température de 80°C pendant 10 minutes. La densité optique a été enregistrée à  $\lambda = 530\text{nm}$ . L'absorbance est directement proportionnelle à la quantité de MDA formé, donnant ainsi une évaluation précise des lipides peroxydés.

La concentration du MDA est calculée selon la loi de Beer-Lambert ( $DO = E.C.L$ )

$$[\text{MDA}] (\text{nmol/mgprotein}) = \frac{DO \times 10^6}{\epsilon \times L \times \chi \times Fd}$$

**C**: Concentration en nmol/mg de protéine

**DO** : densité optique lue à 530 nm

$\epsilon$  : coefficient d'extinction molaire du MDA =  $1.56 \cdot 10^5 \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$

**X** : concentration de l'extrait en protéines (mg/ml)

**Fd** : facteur de dilution  $Fd = 0.2083$ .

### ➤ Dosage de la Méthionine (MTs) Tissulaire

La procédure expérimentale du dosage des méthionine est la suivante

- + Prélever 1ml de surnageant
- + Ajouter 1.05ml d'éthanol froid (-20°C)
- + Ajouter 80µl de chloroforme
- + Centrifuger ensuite le mélange à 6000g pendant 10min (à 4°C)
- + Ajouter au surnageant obtenu 3 volumes de l'éthanol froid (-20°C) pendant 1 heure
- + Centrifuger à 6000g pendant 10min
- + Laver la pastille contenant de la métallothionine dans une solution à 87% d'éthanol et 1% de chloroforme dans le tampon d'hydrogénisation
- + Centrifuger de nouveau à 6000g pendant 10min

L'analyse fait appel à la réaction de la DTNB avec les groupes sulfhydryles indiquée par Ellman (1958, 1959)

- + Resuspendre la pastille contenant la métallothionine dans 150µl NaCl (250mM)
- + Ajouter 150µl HCl (0.1N) et EDTA (4mM)
- + Ajouter ensuite un volume de 4.2ml NaCl(2M), tampon phosphate (0.2M, PH=8), ainsi que 0.43 DTNB (0.43mM) à la solution contenant la métallothionine à température ambiante
- + Mélanger et centrifuger à 3000g pendant 5min
- + Lire l'absorbance de surnageant à une longueur d'onde 412nm

La concentration de MT est calculée selon l'équation suivante :

$$[\text{MTs}] \mu\text{g/g} = \frac{[\text{GSH}] \times 8600}{307.3 \times 21 \times Pf} \times 100$$

**C(MTs)** : concentration en MTs

**8600** : masse molaire de MTs

**307.3** : masse molaire de GSH

**pf**: poids frais de l'organe (g)

**21** : nombre de groupements SH par molécule de MTs

- **Dosage de l'activité de la Superoxyde Dismutase (SOD)**

La procédure expérimentale du dosage de la superoxyde dismutase est la suivante :

- ✚ Prélever 0.1 ml de mélange (méthionine (13mM) et Na<sub>2</sub>EDTA (0.1mM)).
- ✚ Ajouter 0.8922ml de tampon phosphate (50mM, pH=7.8).
- ✚ Ajouter 0.05ml du surnageant.
- ✚ Ajouter 0.95ml de tampon phosphate.
- ✚ Ajouter 0.0852ml de NBT (2.64mM).
- ✚ Ajouter 0.0226ml de riboflavine (0.26mM).

La réduction du NBT est estimée après 20min à une longueur d'onde 580nm contre le blanc. Le pourcentage (Y) contre unité de SOD (quantité des protéines enzymatiques capable d'inhiber 50% de NBT) peut être calculé selon l'équation suivante :

$$Y = \left[ \frac{DO_{\text{étalon}} - DO_{\text{échant}}}{DO_{\text{étalon}}} \times 100 \right] \times \frac{20}{C}$$

**20** : Facteur de dilution de l'échantillon dans le milieu réactionnel.

**C** : la concentration des protéines dans l'échantillon (mg/ml).

- **Dosage de la glutathion peroxydase (GSH-Px)**

Cette méthode est basée sur la réduction de peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en présence de glutathion réduit (GSH), ce dernier est transformé en (GSSG) sous l'influence de la GSH-Px selon la réaction suivante :

GSH-Px



Pour cela que, nous avons procédé aux étapes suivantes :

- ✚ Prélever 0.2 ml de l'homogénat (surnageant).
- ✚ Ajouter 0.4 ml de GSH (0.1 mM).
- ✚ Ajouter 0.2 ml de la solution tampon TBS (Tris 50 mM, NaCl 150 mM pH 7.4).
- ✚ Incuber au bain marie à 25°C, pendant 5 min.

- ✚ Ajouter 0.2ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1.3 mM) pour initier la réaction, laisser agir pendant 10 minutes.
- ✚ Ajouter 1 ml de TCA (1%) pour arrêter la réaction.
- ✚ Mettre le mélange dans la glace pendant 30 minutes.
- ✚ Centrifuger durant 10 minutes à 3000 tours /minutes.
- ✚ Prélever 0.48 ml du surnageant.
- ✚ Ajouter 2.2 ml de la solution tampon TBS.
- ✚ Ajouter 0.32 ml de DTNB (1.0 mM)
- ✚ Mélanger et après 5 minutes lire les densités optiques à 412 nm.

La détermination de l'activité enzymatique de la GSH-Px se fait à l'aide de la formule suivante :

$$GSH-Px (\mu mol GSH/mg protéine) = \frac{DO_{échanti} \times DO_{étalon} \times 5}{DO_{étalon} \times mgprot} \times 0.04$$

**DO<sub>échantillon</sub>** : Densité optique de l'échantillon.

**DO<sub>étalon</sub>** : Densité optique de l'étalon.

- **0.04** : Concentration de substrat (GSH).

- **Dosage de la glutathion-S-transferase (GSTs)**

celle-ci consiste à faire agir les GSTs contenues dans l'homogénat sur un mélange (GSH+CDNB) à une température de 37°C et à un PH de 6.5. la variation de la densité optique, due à l'apparition du complexe GSH-CDNB, est mesurée pendant 1minute durant 5minutes à une longueur d'onde de 340nm.

Les réactifs utilisés	Essai (µl)	Blanc (µl)
<b>Tampon phosphate (0.1M, PH6.5)</b>	850	830
<b>CDNB (0.02M)</b>	50	50
<b>GSH (0.1M)</b>	100	100
<b>Homogénat</b>	-	20

La valeur de la densité optique du blanc (conjugaison spontanée du substrat) a été ensuite retranchée à la valeur de chaque essai afin de mesurer la variation due uniquement à l'activité de l'enzyme.

La concentration de la GST est obtenue par la formule suivante :

$$\text{GST (nmolGST/min/mg protein)} = \frac{DO_{\text{éch}} / \text{min} - DO_{\text{blanc}} / \text{min}}{9.6 \times \text{mgprot}}$$

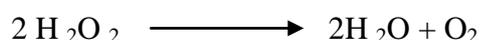
**DO** : densité optique de l'échantillon /min

**DO/min blanc** : densité optique du blanc/min

**9.6** : coefficient d'extinction du GSH-CDNB exprimé en Mm.cM

- **Dosage de la catalase**

Les catalase sont présentés dans un grand nombre de tissus. Ce sont des enzymes tétramériques, chaque unité portant une molécule d'hème et une molécule de NADPH. Ces enzymes interviennent dans la défense de la cellule contre le stress oxydant en éliminant les dérivés actifs de l'oxygène et en accélérant la réaction spontanée de dismutation du peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) en eau et en oxygène. La réaction se fait en deux étapes :



( $\epsilon = 40 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) en faisant réagir dans 100 mM de tampon phosphate pendant 1 min à pH 7.4, 200 $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (500mM) sur 20 $\mu\text{l}$  du S9, à une température d'incubation de 25°C. Les résultats ont été exprimés en  $\mu\text{mol}$  d'  $\text{H}_2\text{O}_2$  par mg de protéines.

Le tableau ci-dessous représente les concentrations et les quantités des réactifs nécessaires au dosage de l'activité catalase.

Les réactifs utilisés	Essai (µl)	Blanc (µl)
<b>Tampon phosphate (100Mm, PH7.5)</b>	790	800
<b>H2O2 (500Mm)</b>	200	200
<b>Sg (1 à 1.5 mg prt/ml)</b>	10	0

**S9** : la quantité du surnageant doit être déterminée en fonction de la quantité de protéine qui doit être comprise entre 1 et 1.5 mg/ml soit une quantité de 10 à 20 µl de S9.

La lecture de l'absorption se fait après 15 secondes de délai et durant 60 secondes de mesure.

L'activité CAT est calculée selon l'équation suivante :

$$\text{Activité de la catalase } (\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 / \text{min} / \text{mg prot}) = \frac{\Delta DO}{\varepsilon \times L \times \chi \times Fd}$$

$\varepsilon$  : Coefficient d'extinction (= 0.043 mM<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>).

$L$  : La longueur de la cuve utilisée (1 cm).

$X$  : La quantité des protéines mg/ml.

$Fd$  : 0.02 (facteur de dilution pour le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans le tampon).

$\lambda$  : 240 nm.

### ➤ Dosage des protéines tissulaire et érythrocytaires

#### 🔧 Mode opératoire

- Prélever 0.1ml de l'homogénat.
- Ajouter 5ml du réactif coloré (BBC).
- Agiter et laisser 5 min pour la stabilisation de la couleur.
- Mesurer l'absorbance de l'échantillon à 595 nm contre le blanc contenant l'eau distillée

à la place de l'homogénat. La densité optique obtenue est rapportée sur la courbe d'étalonnage préalablement tracé (0 → 1mg/ml de sérum albumine de bovin).

## 2.6. L'étude histologique

Elle comporte les étapes suivantes :

### ➤ **Fixation**

La fixation des échantillons (foie et rein) à été faite dans le formol.

Les organes sont retirés de formol et sont coupés à l'aide de couteaux tranchant à fin de réaliser des prélèvements pour l'étude histologique avec une surface de 1 à 2 cm<sup>2</sup> et une épaisseur proche de 1.5 mm. Les prélèvements réalisés sont alors mis dans des cassettes spéciales à parois tournées afin de permettre le passage des liquides.

### ➤ **Déshydratation des échantillons**

Les échantillons sont ensuite déshydratés pendant 12 heures au minimum pour éliminer l'eau des tissus et cette opération nécessite le passage du tissu dans des bains d'éthanol de concentration croissante (70%,80%,90% et 100%). La déshydratation peut être accélérée par l'agitation rapide grâce à des automates spécieux.

### ➤ **L'inclusion et réalisation des blocs**

Les tissus sont alors plongés dans des bains de paraffine liquide (sous l'effet de la chaleur).Les tissus étant maintenu et imbibés de paraffine, viennent alors l'étape de l'enrobage qui consiste à inclure le tissu imprégné dans un bloc de paraffine qui, en se solidifiant, va permettre sa coupe. Cette opération fait appel à des appareils « dits à inclusion » refermant un réservoir de paraffine maintenue à l'état liquide par un système de chauffage, un petit robinet et une plaque métallique réfrigérée pour obtenir la solidification rapide du bloc de paraffine contenant le tissu.

### ➤ **Les Coupes et la coloration des échantillons**

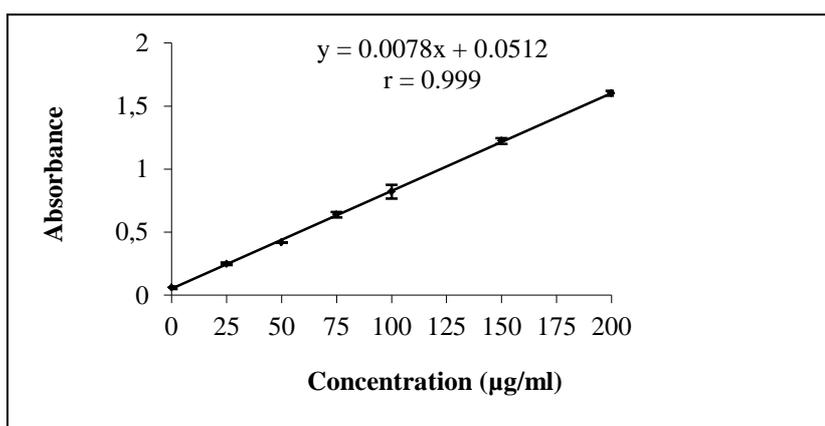
Les blocs d'inclusions sont collés sur un porte-échantillon, la surface à coller est ramollie au moyen d'une lame métallique chauffée modérément à la flamme, puis posée sur le porte-objet sur lequel le bloc adhère très bien après une légère pression. Les coupes sériées sont réalisées à l'aide d'un microtome (l'épaisseur est de 4 à 7 microns). Ces coupes sont étalées et fixés sur la lame par l'utilisation d'une eau gélatineuse chauffée.

Pour la coloration, on a utilisé la technique à l'Hématoxyline-Eosine (ou Hématoéine- Eosine) qui nécessite la présence de l'alcool acide (100 ml d'alcool éthylique à 70% + 50 ml d'acide HCl), eau ammoniacale (100ml d'eau distillée + 2 ml d'ammoniaque) et solution d'Eosine

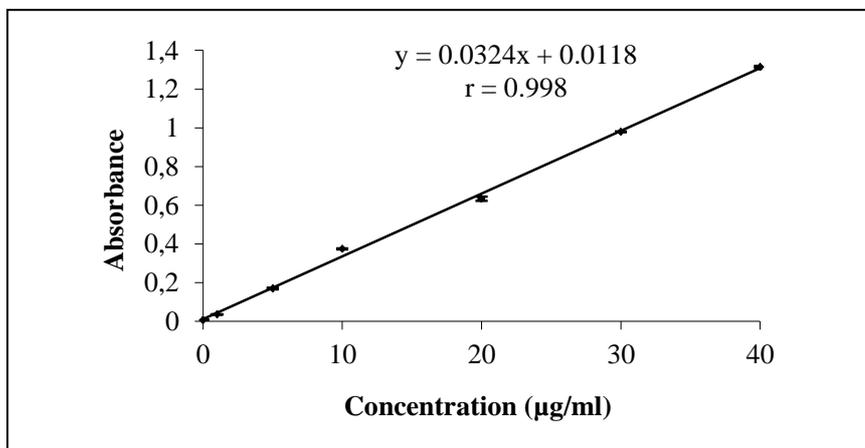
(100ml Eosine solution aqueuse à 3%, 125 ml alcool éthylique à 95%, 375ml eau distillée et 2 gouttes d'acide acétique) selon les étapes suivantes :

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

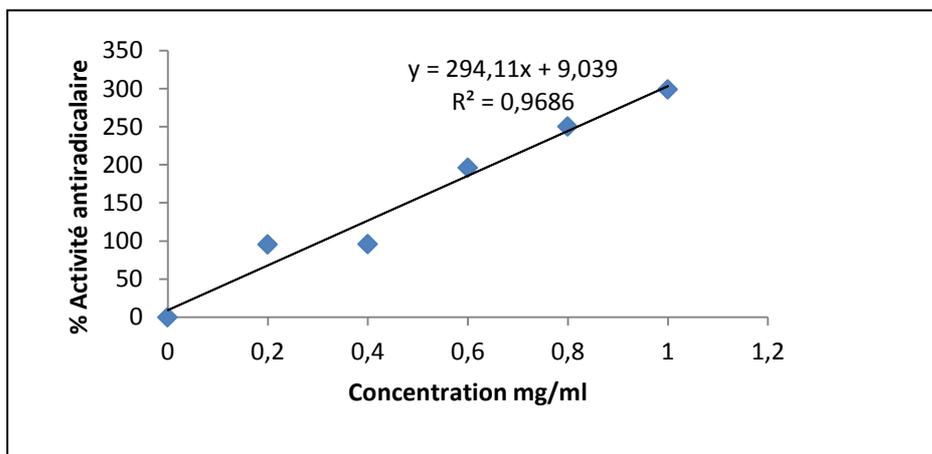
**Annexe 03 :** réalisation des gammes d'étalonnage de l'acide gallique et la quercétine et l'activité antiradicalaire vis-à-vis le DPPH.



Droite d'étalonnage de l'acide gallique (moyenne  $\pm$  SEM de trois mesures).



Droite d'étalonnage de la quercétine (moyenne  $\pm$  SEM de trois mesures).



Corrélation linéaire entre la concentration de l'huile d'argane et le pourcentage de l'activité antiradicalaire.

#### Annexe 04 : Préparation des solutions

##### 1. Dosage du glutathion

###### + Solution d'EDTA (0.02M)

- EDTA.....7.4448 g
- Eau distillée.....qsp 1000 ml

###### + Solution de SAA (0.25%)

- SAA.....0.25g
- Eau distillée.....qsp 1000 ml

###### + Tampon Tris+ EDTA (0.4 M Tris + 0.02 M , PH=9.6)

- Tris.....63.04g
- EDTA.....7.4448 g

- Eau distillée.....qsp 1000 ml
- ✚ **Solution de DTNB (0.01M)**
  - DTNB.....3.96g
  - Méthanol absolu.....qsp 1000ml
- 2. Dosage du MDA**
- ✚ **Solution TCA-BHT (TCA20%+BHT1%)**
  - TCA.....20g
  - BHT.....1g
  - Eau distillée.....qsp 100 ml
- ✚ **Solution HCL (0.6M)**
  - HCL.....51.56ml
  - Eau distillée.....qsp 1000 ml
- ✚ **Solution Tris-TBA(26m M Tris+120m M TBA)**
  - Tris.....3.149g
  - TBA.....17.299g
  - Eau distillée.....qsp 1000 ml
- 3. Dosage du glutathion peroxydase (GPx)**
- ✚ **Solution de GSH (0.1 m M)**
  - GSH.....30.73g
  - Eau distillée.....qsp 1000 ml
- ✚ **Solution TCA (1%)**
  - TCA.....1g
  - Eau distillée.....qsp 100ml
- ✚ **Solution DTNB (1 m M)**
  - DTNB.....3.96mg
  - Méthanol absolu.....qsp 1000 ml
- 4. Dosage du Glutathion –S-Transferase (GST)**
- ✚ **Solution CDNB (0.02M)**
  - CDNB.....4.04g
  - Ethanol absolu .....qsp 1000 ml
- ✚ **Solution GSH (0.1 M)**
  - GSH.....3.06g
  - Eau distillée.....qsp 1000 ml
- 5. Dosage de la catalase**

### ✚ Solution H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (500mM)

- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.....17ml
- Eau distillée.....qsp 1000 ml

## 6. Dosage des protéines par la méthode de Bradford

### ✚ Réactif de Bradford

- Bleu de coomassie.....0.1g
- Ethanol(95%).....50ml

Agitation pendant deux heures (agitation magnétique) puis ajouter

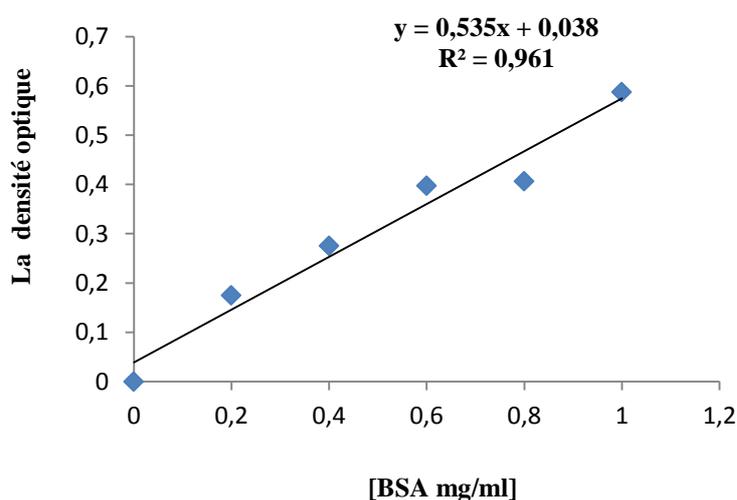
- Acide orthophosphorique (85%)
- Eau distillée.....qsp 1000 ml

Ce réactif doit être filtré puis conserver pendant 1 mois à une température de 4°C et à l'abri de la lumière.

### Annexe 05 : Réalisation de la gamme d'étalonnage des protéines

- BSA.....1g
- Eau distillée.....qsq1000ml

Tubes	1	2	3	4	5	6
BSA (µl)	0	20	40	60	80	100
Eau distillée (µl)	100	80	60	40	20	0
BC (ml)	5	5	5	5	5	5



**Annexe 06 :** Variation de gain du poids corporel chez le lot témoin et les lots traité par Se, H, H/Se, Hg, Se/Hg, H /Hg et H +Se/Hg après 21 jours de traitement.

paramètres	Les lots expérimentales							
	Témoin	Se	H	H /Se	Hg	Se/Hg	H/Hg	H+ Se/Hg
<b>Poids initial (g)</b>	217.6±5.6	218.12±13	216.3±5.3	215.3±2.3	220.87±7.6	219.43±6.7	220±9.7	219.4±9.2
<b>Poids final (g)</b>	220.5±5.8	219±13.5	219.61±5.6	218.16±2.7	216.3±7.3	217.11±6.1	221.6±9	221.5±9.6
<b>Gain de poids</b>	+3.5±0.2	+1.16±0.5	+3.31±0.3	+3.86±0.4	-4.57±0.3	-2.32±0.6	+0.89±0. 01	+2.5±0.1

**Annexe 07 :** Variation des poids relatifs des organes (foie, des reins et de la rate) chez le lot témoin et les lots traités par le Se, H, Se/H, Hg, Se/Hg, H/Hg et H+Se/Hg après 21 jours de traitement. Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  SEM de 08 rats)

Les paramètres	Les lots expérimentaux							
	Témoin	Se	H	H+Se	Hg	Se+Hg	H+Hg	H+Se+Hg
Poids relatif du foie	3.34 $\pm$ 0.07	3.73 $\pm$ 0.11	3.6 $\pm$ 0.15	3.4 $\pm$ 0.1	5.47 $\pm$ 0.0 <sup>a3</sup>	3.55 $\pm$ 0.1 <sup>b3</sup>	3.37 $\pm$ 0.1	3.29 $\pm$ 0.1 <sup>b3</sup>
Poids relatif du rein	0.81 $\pm$ 0.04	0.76 $\pm$ 0.03	0.77 $\pm$ 0.03	0.8 $\pm$ 0.04	0.94 $\pm$ 0.0 <sup>a2</sup>	0.86 $\pm$ 0.04	0.83 $\pm$ 0.0 <sup>b2</sup>	0.82 $\pm$ 0.0 <sup>b3</sup>
Poids relatif de la rate	0.34 $\pm$ 0.009	0.35 $\pm$ 0.01	0.36 $\pm$ 0.01	0.35 $\pm$ 0.01	0.45 $\pm$ 0.0 <sup>a3</sup>	0.43 $\pm$ 0.0 <sup>a1</sup>	0.4 $\pm$ 0.02 <sup>a1</sup>	0.35 $\pm$ 0.0 <sup>b2</sup>

**a1 :** Différence significative comparant au témoin ( $P \leq 0.05$ ). **a2 :** Différence hautement significative comparant au témoin ( $P \leq 0.01$ ). **a3 :** Différence très hautement significative comparant au témoin ( $P \leq 0.001$ ).

**b2 :** Différence hautement significative comparant au lot traité par le chlorure de mercure ( $P \leq 0.01$ ).

**b3 :** Différence très hautement significative comparant au lot traité par le chlorure de mercure ( $P \leq 0.001$ ).

**Annexe 08.** Variation de la concentration sérique de quelques paramètres biochimiques chez le lot témoin et les lots traités par le Se, H, Se/H, Hg, Se/Hg, H/Hg et H+Se/Hg après 21 jours de traitement. Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  SEM de 08 rats).

Les paramètres	Les lots expérimentaux							
	Témoin	Se	H	H+Se	Hg	Se+Hg	H+Hg	H+Se+Hg
Glucose (g/l)	0.77 $\pm$ 0.1	0.74 $\pm$ 0.04	0.72 $\pm$ 0.05	0.77 $\pm$ 0.1	1.02 $\pm$ 0.11	0.88 $\pm$ 0.04	0.81 $\pm$ 0.02	0.77 $\pm$ 0.03 <sup>b1</sup>
Urée (mg/dl)	0.47 $\pm$ 0.06	0.47 $\pm$ 0.01	0.46 $\pm$ 0.01	0.47 $\pm$ 0.01	0.89 $\pm$ 0.01 <sup>a3</sup>	0.61 $\pm$ 0.01a <sup>b3</sup>	0.49 $\pm$ 0.02 <sup>b3</sup>	0.48 $\pm$ 0.01 <sup>b3</sup>
Créatinine (mg/dl)	2.68 $\pm$ 0.36	2.5 $\pm$ 0.25	2.63 $\pm$ 0.16	2.6 $\pm$ 0.15	7.13 $\pm$ 0.88 <sup>a3</sup>	4.87 $\pm$ 0.54 <sup>a1b1</sup>	2.91 $\pm$ 0.3 <sup>b3</sup>	2.68 $\pm$ 0.35 <sup>b3</sup>
Acide urique (mg/dl)	21.67 $\pm$ 1.5	23.93 $\pm$ 1.6	23.94 $\pm$ 1.6	22.7 $\pm$ 1.6	45.7 $\pm$ 0.72 <sup>a3</sup>	33.1 $\pm$ 1.1 <sup>a3b3</sup>	25.15 $\pm$ 1.3 <sup>b3</sup>	24.73 $\pm$ 0.57 <sup>b3</sup>
Bilirubine total (mg/dl)	1.84 $\pm$ 0.05	1.98 $\pm$ 0.11	1.73 $\pm$ 0.1	1.84 $\pm$ 0.05	3.59 $\pm$ 0.13 <sup>a3</sup>	2.56 $\pm$ 0.07 <sup>a3b3</sup>	2.18 $\pm$ 0.16 <sup>b3</sup>	1.9 $\pm$ 0.03 <sup>b3</sup>
Bilirubine directe (mg/dl)	0.35 $\pm$ 0.03	0.29 $\pm$ 0.03	0.28 $\pm$ 0.03	0.3 $\pm$ 0.01	0.73 $\pm$ 0.01 <sup>a3</sup>	0.53 $\pm$ 0.03 <sup>a3b3</sup>	0.43 $\pm$ 0.04 <sup>b3</sup>	0.37 $\pm$ 0.04 <sup>b3</sup>
Protéine Totale (g/dl)	83.41 $\pm$ 1.1	80.47 $\pm$ 3.1	79.08 $\pm$ 1.21	80.7 $\pm$ 1.1	54.86 $\pm$ 1.18 <sup>a3</sup>	60.36 $\pm$ 4.5 <sup>a3</sup>	63.54 $\pm$ 3.85	82.51 $\pm$ 2 <sup>b3</sup>
Albumine (g/dl)	30.6 $\pm$ 1.3	29.8 $\pm$ 0.76	29.99 $\pm$ 0.79	30.4 $\pm$ 1.2	18.63 $\pm$ 1.1	24.37 $\pm$ 1.8 <sup>a1b1</sup>	28.36 $\pm$ 1.4 <sup>b3</sup>	30.97 $\pm$ 1 <sup>b3</sup>

**a<sub>1</sub>** : Différence significative comparant au témoin (P $\leq$  0,05). **a<sub>2</sub>**: Différence hautement significative comparant au témoin (P $\leq$ 0,01). **a<sub>3</sub>**: Différence très hautement significative comparant au témoin (P $\leq$ 0,001). **b<sub>1</sub>**: Différence significative comparant au lot traité par chlorure de mercure (P $\leq$ 0,05). **b<sub>2</sub>**: Différence hautement significative comparant au lot traité par le chlorure de mercure (P $\leq$ 0,01).

**b<sub>3</sub>**: Différence très hautement significative comparant au lot traité par le chlorure de mercure (P $\leq$ 0,001).

**Annexe 09 :** Variation de la concentration sérique de quelques paramètres Lipidiques chez le lot témoin et les lots traités par le Se, H, Se/H, Hg, Se/Hg, H/Hg et H+Se/Hg après 21 jours de traitement. Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  SEM de 08 rats).

Les paramètres	Les lots expérimentaux							
	Témoin	Se	H	H+Se	Hg	Se+Hg	H+Hg	H+Se+Hg
Triglycérides (mg/dl)	0,78 $\pm$ 0,04	0,93 $\pm$ 0,09	0,61 $\pm$ 0,13	0,82 $\pm$ 0,01	1,32 $\pm$ 0,21 <sup>a1</sup>	1,31 $\pm$ 0,2 <sup>a1</sup>	1,23 $\pm$ 0,15	0,89 $\pm$ 0,1 <sup>a2</sup>
Cholestérol (mg/dl)	0,68 $\pm$ 0,06	0,71 $\pm$ 0,03	0,73 $\pm$ 0,03	0,69 $\pm$ 0,03	0,82 $\pm$ 0,04	0,79 $\pm$ 0,02	0,78 $\pm$ 0,03	0,7 $\pm$ 0,03
Lipides totaux (mg/dl)	1,48 $\pm$ 0,13	1,52 $\pm$ 0,12	1,62 $\pm$ 0,1	1,6 $\pm$ 0,1	3,93 $\pm$ 0,17 <sup>a3</sup>	3,37 $\pm$ 0,2 <sup>a3</sup>	3,1 $\pm$ 0,2	2,73 $\pm$ 0,2 <sup>a3</sup>
DICTI( $\mu$ mol/l)	23,47 $\pm$ 0,4	23,24 $\pm$ 0,1	23,05 $\pm$ 0,7	23,4 $\pm$ 0,1	27,23 $\pm$ 0,1 <sup>a3</sup>	24,9 $\pm$ 0,6 <sup>b2</sup>	24,58 $\pm$ 0,8	24,13 $\pm$ 0,8 <sup>b2</sup>
DICT max ( $\mu$ mol/l)	32,71 $\pm$ 0,4	32,77 $\pm$ 2,4	32,33 $\pm$ 2,6	33,1 $\pm$ 0,4	46,78 $\pm$ 0,63 <sup>a3</sup>	41,22 $\pm$ 3,6	37,92 $\pm$ 2,9 <sup>b2</sup>	36,41 $\pm$ 2,7 <sup>b2</sup>
TLag (min)	30,47 $\pm$ 0,9	29,51 $\pm$ 0,3	29,5 $\pm$ 0,28	28,5 $\pm$ 0,3	25,2 $\pm$ 0,6 <sup>a3</sup>	27,15 $\pm$ 0,6 <sup>a3b3</sup>	26,05 $\pm$ 0,1 <sup>a3b3</sup>	27,87 $\pm$ 0,3 <sup>a3b3</sup>
T max (min)	70,15 $\pm$ 0,13	69,88 $\pm$ 0,17	69,96 $\pm$ 0,14	70,1 $\pm$ 0,13	66,7 $\pm$ 0,18 <sup>a3</sup>	67,47 $\pm$ 0,15 <sup>a3b2</sup>	68,16 $\pm$ 0,16 <sup>a3b3</sup>	69,62 $\pm$ 0,12 <sup>a2b3</sup>
Taux d'oxidatin ( $\mu$ mol/l/min)	0,23 $\pm$ 0,02	0,23 $\pm$ 0,01	0,22 $\pm$ 0,04	0,23 $\pm$ 0,02	0,47 $\pm$ 0,02 <sup>a3</sup>	0,4 $\pm$ 0,02 <sup>b2</sup>	0,31 $\pm$ 0,01 <sup>a3b3</sup>	0,29 $\pm$ 0,01 <sup>a2b3</sup>

**a1 :** Différence significative comparant au témoin ( $P \leq 0,05$ ), **a2 :** Différence hautement significative comparant au témoin ( $P \leq 0,01$ ), **a3 :** Différence très hautement significative comparant au témoin ( $P \leq 0,001$ ), **b1 :** Différence hautement significative comparant au lot traité par le chlorure de mercure ( $P \leq 0,01$ ), **b2 :** Différence très hautement significative comparant au lot traité par le chlorure de mercure ( $P \leq 0,001$ ), **P :** seuil de signification

**Annexe10:** Variation de l'activité sérique de quelques paramètres enzymatiques chez le lot témoin et les lots traités par le Se, H, Se/H, Hg, Se/Hg, H/Hg et H+Se/Hg après 21 jours de traitement. Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  SEM de 08 rats).

Les paramètres	Les lots expérimentaux							
	Témoin	Se	H	H+Se	Hg	Se+Hg	H+Hg	H+Se+Hg
AST (U/L)	126,45 $\pm$ 22	110,91 $\pm$ 23	113,4 $\pm$ 22	120,4 $\pm$ 21	153,02 $\pm$ 17	149,47 $\pm$ 9	132,64 $\pm$ 8,4	126,69 $\pm$ 13
ALT (U/L)	48,38 $\pm$ 3.3	49,7 $\pm$ 3.3	48,5 $\pm$ 3.5	48,6 $\pm$ 3.3	83,39 $\pm$ 1.1 <sup>a3</sup>	61,97 $\pm$ 4.7 <sup>a1b3</sup>	53,98 $\pm$ 3,9 <sup>b3</sup>	50,69 $\pm$ 3,9 <sup>b3</sup>
PAL (U/L)	201,3 $\pm$ 28	213,8 $\pm$ 14	201,3 $\pm$ 14	210,5 $\pm$ 16	571,18 $\pm$ 44 <sup>a3</sup>	438,69 $\pm$ 32 <sup>a3b1</sup>	237,83 $\pm$ 11 <sup>b3</sup>	211,58 $\pm$ 21 <sup>b3</sup>
LDH (U/L)	409,25 $\pm$ 74	374,63 $\pm$ 36	399,64 $\pm$ 66	384,5 $\pm$ 56	606,53 $\pm$ 72	594 $\pm$ 57	485,12 $\pm$ 86	456,53 $\pm$ 17

**a<sub>1</sub>** : Différence significative comparant au témoin (P $\leq$  0,05). **a<sub>3</sub>** : Différence très hautement significative comparant au témoin (P $\leq$  0,001).

**b<sub>3</sub>** : Différence très hautement significative comparant au lot traité par le chlorure de mercure (P $\leq$ 0,001).

**P** : seuil de signification

**Annexel1:** Variation de la concentration sérique de quelques paramètres hématologique chez le lot témoin et les lots traités par le Se, H, Se/H, Hg, Se/Hg, H/Hg et H +Se /Hg après 21 jours de traitement. Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  SEM de 08 rats).

Les paramètres	Les lots expérimentaux							
	Témoin	Se	H	H+Se	Hg	Se+Hg	H+Hg	H+Se+Hg
<b>GR (10<sup>6</sup>/µl)</b>	10,08 $\pm$ 0.22	9,7 $\pm$ 0.33	9,8 $\pm$ 0.3	10,02 $\pm$ 0.3	7,18 $\pm$ 0.21 <sup>a2</sup>	8,48 $\pm$ 0.12 <sup>a3b1</sup>	8,61 $\pm$ 0.18 <sup>b2</sup>	9,2 $\pm$ 0.24
<b>GB (10<sup>3</sup>/µl)</b>	8,35 $\pm$ 0.69	7,39 $\pm$ 0.8	7,38 $\pm$ 0.95	8,02 $\pm$ 0.6	13,66 $\pm$ 1.4 <sup>a2</sup>	11,23 $\pm$ 0.95 <sup>a1</sup>	10,03 $\pm$ 0.53 <sup>b2</sup>	8,96 $\pm$ 0.4 <sup>b2</sup>
<b>Hb (g/dl)</b>	17,26 $\pm$ 0.13	16,38 $\pm$ 0.59	17,25 $\pm$ 0.5	17,4 $\pm$ 0.2	15,26 $\pm$ 0.22	15,36 $\pm$ 0.23	16,2 $\pm$ 0.3	16,37 $\pm$ 0.4
<b>HT (%)</b>	56,05 $\pm$ 0.61	53,6 $\pm$ 1.9	53,7 $\pm$ 3.1	54,2 $\pm$ 1.2	47,66 $\pm$ 3.06 <sup>a1</sup>	48,28 $\pm$ 0.67 <sup>a3</sup>	51,46 $\pm$ 1.3	51,17 $\pm$ 1.1 <sup>a2</sup>
<b>VGM (fl)</b>	58,37 $\pm$ 2.04	58,92 $\pm$ 0.31	57,93 $\pm$ 0.55	58,3 $\pm$ 0.9	45,66 $\pm$ 0.69 <sup>a3</sup>	46,7 $\pm$ 13.8 <sup>a3b3</sup>	51,46 $\pm$ 3.81 <sup>a2b3</sup>	56,93 $\pm$ 0.55 <sup>b2</sup>
<b>TGMH (Pg)</b>	18,38 $\pm$ 0.37	18,38 $\pm$ 0.48	18,43 $\pm$ 0.26	18,4 $\pm$ 0.26	17,16 $\pm$ 0.3	17,18 $\pm$ 0.29	17,62 $\pm$ 0.23	17,83 $\pm$ 0.23
<b>CCMH (fl)</b>	30,71 $\pm$ 0.34	30,74 $\pm$ 0.41	30,89 $\pm$ 0.42	30,8 $\pm$ 0.41	34,54 $\pm$ 1.5 <sup>a1</sup>	31,82 $\pm$ 0.34	31,46 $\pm$ 0.21	31,25 $\pm$ 0.34

**a<sub>1</sub>** : Différence significative comparant au témoin (P $\leq$ 0.05). **a<sub>2</sub>** : Différence hautement significative comparant au témoin (P $\leq$ 0,01). **a<sub>3</sub>** : Différence très hautement significative comparant au témoin (P $\leq$ 0,001).  
**b<sub>1</sub>** : Différence significative comparant au lot traité par chlorure de mercure (P $\leq$ 0,05).

**b<sub>2</sub>** : Différence hautement significative comparant au lot traité par le chlorure de mercure (P $\leq$ 0,01). **b<sub>3</sub>** : Différence très hautement significative comparant au lot traité par le chlorure de mercure (P $\leq$ 0,001)

**P** : seuil de signification.

**Annexe12:** Variation de la concentration sérique de quelques paramètres immunologiques chez le lot témoin et les lots traités par le Se, H, Se/H, Hg, Se/Hg, H/Hg et H+Se /Hg après 21 jours de traitement. Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  SEM de 08 rats).

Les paramètres	Les lots expérimentaux							
	Témoin	Se	H	H+Se	Hg	Se+Hg	H+Hg	H+Se+Hg
IL1 (Pg/ml)	0,06 $\pm$ 0.03	0,074 $\pm$ 0.01	0,066 $\pm$ 0.01	0,066 $\pm$ 0.01	0,602 $\pm$ 0.09 <sup>a3</sup>	0,24 $\pm$ 0.09 <sup>b2</sup>	0,185 $\pm$ 0.02 <sup>a1b3</sup>	0,15 $\pm$ 0.009 <sup>b3</sup>
IL6 (Pg/ml)	0,066 $\pm$ 0.02	0,063 $\pm$ 0.01	0,063 $\pm$ 0.01	0,064 $\pm$ 0.01	0,32 $\pm$ 0.13 <sup>a1</sup>	0,201 $\pm$ 0.02	0,131 $\pm$ 0.04	0,109 $\pm$ 0.07
TNF $\alpha$ (Pg/ml)	0,05 $\pm$ 0.01	0,054 $\pm$ 0.009	0,063 $\pm$ 0.005	0,058 $\pm$ 0.005	0,413 $\pm$ 0.01 <sup>a2</sup>	0,191 $\pm$ 0.06 <sup>a1b1</sup>	0,147 $\pm$ 0.03 <sup>a2b2</sup>	0,1 $\pm$ 0.01 <sup>a1b2</sup>
Activité phagocytaire	0,041 $\pm$ 0.009	0,058 $\pm$ 0.002	0,094 $\pm$ 0.001	0,167 $\pm$ 0.00 <sup>a1</sup>	0,023 $\pm$ 0.001	0,03 $\pm$ 0.001	0,032 $\pm$ 0.003 <sup>b1</sup>	0,037 $\pm$ 0.001
Taux de la clearance de carbone	20,99 $\pm$ 0.9	11,09 $\pm$ 0.2	18,37 $\pm$ 0.1	5,32 $\pm$ 0.4 <sup>a1</sup>	29,72 $\pm$ 0.1	50,81 $\pm$ 0.1	22,04 $\pm$ 0.3 <sup>b1</sup>	21,36 $\pm$ 0.1

**a1 :** Différence significative comparant au témoin ( $P \leq 0,05$ )

**b1 :** Différence significative comparant au lot traité par chlorure de mercure ( $P \leq 0,05$ ). **P :** Seuil de signification.

**Annexe13 :** Variation de la concentration sérique de quelques paramètres de la capacité antioxydantes plasmatique chez le lot témoin et les lots traités par le Se, H, Se/H, Hg, Se/Hg, H/Hg et H +Se /Hg après 21 jours de traitement. Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  SEM de 08 rats).

Les paramètres	Les lots expérimentaux							
	Témoin	Se	H	H+Se	Hg	Se+Hg	H+Hg	H+Se+Hg
%Capacité antioxydante plasmatique (DPPH)	74,03 $\pm$ 1.2	82,77 $\pm$ 1.3 <sup>a2</sup>	89,83 $\pm$ 2.5 <sup>a2</sup>	90,54 $\pm$ 2.6 <sup>a2</sup>	31,66 $\pm$ 1.5 <sup>a3</sup>	67,2 $\pm$ 0.44 <sup>a2b3</sup>	70,3 $\pm$ 0.26 <sup>a1b3</sup>	73,46 $\pm$ 0.38 <sup>b3</sup>
Vitamine C( $\mu$ mol/l)	38,16 $\pm$ 1.3	38,2 $\pm$ 1.32	36,4 $\pm$ 1.29	37,4 $\pm$ 1.23	15,23 $\pm$ 0.23 <sup>a3</sup>	19,01 $\pm$ 1.21 <sup>a3b3</sup>	22 $\pm$ 2.1 <sup>a3b3</sup>	32,05 $\pm$ 1,9 <sup>a3b3</sup>
Vitamine E ( $\mu$ mol/l)	33,16 $\pm$ 1.8	33,12 $\pm$ 0.8	34,4 $\pm$ 0.18	33,1 $\pm$ 1.8	13,05 $\pm$ 1.5 <sup>a3</sup>	23,4 $\pm$ 2.7 <sup>a3</sup>	24,1 $\pm$ 0.7 <sup>a2b1</sup>	27,2 $\pm$ 1.1 <sup>b3</sup>
Thiols plasmatique ( $\mu$ mol/l)	3,5 $\pm$ 0.22	3,3 $\pm$ 0.05	3,45 $\pm$ 0.18	3,4 $\pm$ 0.02	2,3 $\pm$ 0.16 <sup>a3</sup>	2,71 $\pm$ 0.05 <sup>a2b1</sup>	3,06 $\pm$ 0,01 <sup>b3</sup>	3,08 $\pm$ 0,05 <sup>b2</sup>

**a1 :** Différence significative comparant au témoin ( $P \leq 0,05$ ), **a2 :** Différence hautement significative comparant au témoin ( $P \leq 0,01$ ), **a3 :** Différence très hautement significative comparant au témoin ( $P \leq 0,001$ ).

**b1 :** Différence significative comparant au lot traité par chlorure de mercure ( $P \leq 0,05$ ), **b2 :** Différence hautement significative comparant au lot traité par le chlorure de mercure ( $P \leq 0,01$ ).

**b3 :** Différence très hautement significative comparant au lot traité par le chlorure de mercure ( $P \leq 0,001$ ), **P :** seuil de signification.

**Annexe14 :** Variation de la concentration plasmatique , érythrocytaire et tissulaire de quelque paramètres du stress chez le lot témoin et les lots traités par le Se, H, Se/H, Hg, Se/Hg, H/Hg et H +Se /Hg après 21 jours de traitement. Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  SEM de 08 rats).

Les paramètres	Les lots expérimentaux							
	Témoin	Se	H	H+Se	Hg	Se+Hg	H+Hg	H+Se+Hg
[GSH] hépatique(nmol/mg)	51,49 $\pm$ 12	49,86 $\pm$ 12	50,61 $\pm$ 14	52,4 $\pm$ 13	24,35 $\pm$ 3,9	39,35 $\pm$ 2,5	42,47 $\pm$ 13	46,84 $\pm$ 3,3
[GSH] rénale (nmol/mg)	71,5 $\pm$ 8,9	60,56 $\pm$ 2,1	70,7 $\pm$ 2,4	70,2 $\pm$ 5,4	32,33 $\pm$ 8,7 <sup>a2</sup>	34,71 $\pm$ 9,4 <sup>a2</sup>	53,67 $\pm$ 4,2	65,28 $\pm$ 8,4
[GSH] érythrocytaire (nmol/mg)	42,55 $\pm$ 1,6	39,69 $\pm$ 2,8	39,03 $\pm$ 1,4	38,9 $\pm$ 1,2	28,89 $\pm$ 2,7 <sup>a3</sup>	25,67 $\pm$ 1,4 <sup>a3</sup>	30,08 $\pm$ 2,3 <sup>a3</sup>	32,44 $\pm$ 1,7 <sup>a3</sup>
[METs] hépatique (µg/g)	333,75 $\pm$ 5,5	326,93 $\pm$ 7,6	329,9 $\pm$ 7,6	348,4 $\pm$ 4,5	142,6 $\pm$ 24 <sup>a1</sup>	251,01 $\pm$ 11	267,9 $\pm$ 43 <sup>a2</sup>	317,51 $\pm$ 31 <sup>b3</sup>
[METs] rénale (µg/g)	387,33 $\pm$ 28	377,4 $\pm$ 24	374,5 $\pm$ 25	377,6 $\pm$ 24	166,09 $\pm$ 5,1 <sup>a3</sup>	247,95 $\pm$ 7	287,3 $\pm$ 15	296,74 $\pm$ 28
[MDA] hépatique (nmol/mg prot)	1,6 $\pm$ 0,22	1,77 $\pm$ 0,2	1,85 $\pm$ 0,1	1,82 $\pm$ 0,1	2,6,68 $\pm$ 1,14 <sup>a3</sup>	4,58 $\pm$ 0,57 <sup>a3</sup>	3,79 $\pm$ 0,52 <sup>a2b1</sup>	2,74 $\pm$ 0,54 <sup>b2</sup>
[MDA] rénale (nmol/mg prot)	0,618 $\pm$ 0,2	0,641 $\pm$ 0,18	0,548 $\pm$ 0,18	0,62 $\pm$ 0,1	7,77 $\pm$ 0,81 <sup>a2</sup>	1,36 $\pm$ 0,4	0,99 $\pm$ 0,33	0,674 $\pm$ 0,18
[MDA] plasmatique (µmol/l)	5,53 $\pm$ 0,24	4,73 $\pm$ 0,64	5,12 $\pm$ 0,91	5,3 $\pm$ 0,3	2 $\pm$ 0,52 <sup>a2</sup>	6,46 $\pm$ 0,94 <sup>b1</sup>	5,91 $\pm$ 0,6	5,88 $\pm$ 0,37
MDA] érythrocytaire (nmol/mg prot)	1,5 $\pm$ 0,1	1,75 $\pm$ 0,2	1,6 $\pm$ 0,1	1,7 $\pm$ 0,13	5,78 $\pm$ 1,2 <sup>a3</sup>	4,5 $\pm$ 0,7 <sup>a3</sup>	3,1 $\pm$ 0,3 <sup>a2b2</sup>	2,8 $\pm$ 0,1 <sup>b3</sup>

**a<sub>1</sub>** : Différence significative comparant au témoin (P $\leq$  0,05). **a<sub>2</sub>**: Différence hautement significative comparant au témoin (P $\leq$  0,01). **a<sub>3</sub>** : Différence très hautement significative comparant au témoin (P $\leq$  0,001). **b<sub>1</sub>**: Différence significative comparant au lot traité par chlorure de mercure (P $\leq$ 0,05). **b<sub>2</sub>**: Différence hautement significative comparant au lot traité par le chlorure de mercure (P $\leq$ 0,01).

**b<sub>3</sub>**: Différence très hautement significative comparant au lot traité par le chlorure de mercure (P $\leq$ 0,001). **P** : seuil de signification.

**Annexel5 :** Variation de l'activité enzymatique tissulaire de quelques paramètres du stress chez le lot témoin et les lots traités par le Se, H, Se/H, Hg, Se/Hg, H/Hg et H+Se/Hg après 21 jours de traitement. Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  SEM de 08 rats).

Les paramètres	Les lots expérimentaux							
	Témoin	Se	H	H+Se	Hg	Se+Hg	H+Hg	H+Se+Hg
SOD hépatique (U/mg prot)	0,43 $\pm$ 0,03	0,42 $\pm$ 0,02	0,41 $\pm$ 0,03	0,42 $\pm$ 0,02	0,22 $\pm$ 0,01 <sup>a3</sup>	0,32 $\pm$ 0,01 <sup>a2b3</sup>	0,34 $\pm$ 0,01 <sup>a1b3</sup>	0,38 $\pm$ 0,01 <sup>b3</sup>
SOD rénale (U/mg prot)	0,43 $\pm$ 0,04	0,4 $\pm$ 0,06	0,35 $\pm$ 0,05	0,4 $\pm$ 0,04	0,147 $\pm$ 0,01 <sup>a3</sup>	0,3 $\pm$ 0,03 <sup>a2b3</sup>	0,35 $\pm$ 0,03 <sup>a1b3</sup>	0,39 $\pm$ 0,03 <sup>b3</sup>
GPx hépatique ( $\mu$ mol/min/mg prot)	0,08 $\pm$ 0,006	0,077 $\pm$ 0,008	0,079 $\pm$ 0,007	0,078 $\pm$ 0,006	0,038 $\pm$ 0,002 <sup>a3</sup>	0,051 $\pm$ 0,006 <sup>a2</sup>	0,053 $\pm$ 0,007 <sup>a2b1</sup>	0,062 $\pm$ 0,005 <sup>b3</sup>
GPx rénale ( $\mu$ mol/min/mg prot)	0,071 $\pm$ 0,008	0,077 $\pm$ 0,005	0,079 $\pm$ 0,004	0,078 $\pm$ 0,005	0,015 $\pm$ 0,007 <sup>a3</sup>	0,029 $\pm$ 0,003 <sup>a3b3</sup>	0,033 $\pm$ 0,004 <sup>a2b3</sup>	0,053 $\pm$ 0,006 <sup>b3</sup>
GST hépatique (nmol/min/mg prot)	0,0079 $\pm$ 0,0006	0,0073 $\pm$ 0,0002	0,008 $\pm$ 0,0005	0,0078 $\pm$ 0,0001	0,0029 $\pm$ 0,0002 <sup>a3</sup>	0,004 $\pm$ 0,0001 <sup>a2</sup>	0,0053 $\pm$ 0,0001 <sup>a2</sup>	0,0063 $\pm$ 0,0005 <sup>b2</sup>
GST rénale (nmol/min/mg prot)	0,0034 $\pm$ 0,0004	0,0036 $\pm$ 0,0001	0,0039 $\pm$ 0,0002	0,0038 $\pm$ 0,0003	0,0019 $\pm$ 0,0006 <sup>a3</sup>	0,0021 $\pm$ 0,0001 <sup>a3b2</sup>	0,0024 $\pm$ 0,0002 <sup>b1</sup>	0,003 $\pm$ 0,0001 <sup>b2</sup>
Catalase hépatique ( $\mu$ mol/min/mg prot)	264,42 $\pm$ 11	260,83 $\pm$ 8,8	259,3 $\pm$ 7,1	259,8 $\pm$ 7,1	163,31 $\pm$ 8,3 <sup>a3</sup>	236,34 $\pm$ 11 <sup>b3</sup>	252,08 $\pm$ 11 <sup>b3</sup>	256,84 $\pm$ 9,5 <sup>b3</sup>
Catalase rénale ( $\mu$ mol/min/mg prot)	229,2 $\pm$ 13	227,3 $\pm$ 9,8	228,4 $\pm$ 9,8	229,5 $\pm$ 10,1	161,59 $\pm$ 13,2 <sup>a2</sup>	198,88 $\pm$ 11 <sup>b1</sup>	217,99 $\pm$ 8,7 <sup>b2</sup>	220,39 $\pm$ 12 <sup>b2</sup>

**a<sub>1</sub>** : Différence significative comparant au témoin (P $\leq$  0,05). **a<sub>2</sub>** : Différence hautement significative comparant au témoin (P $\leq$  0,01). **a<sub>3</sub>** : Différence très hautement significative comparant au témoin (P $\leq$  0,001).

**b<sub>1</sub>** : Différence significative comparant au lot traité par chlorure de mercure (P $\leq$  0,05). **b<sub>2</sub>** : Différence hautement significative comparant au lot traité par le chlorure de mercure (P $\leq$  0,01). **b<sub>3</sub>** : Différence très hautement significative comparant au lot traité par le chlorure de mercure (P $\leq$  0,001). **P** : seuil de signification.

**Annexe16 :** Variation de l'activité enzymatique erythrocytaire de quelques paramètres du stress chez le lot témoin et les lots traités par le Se, H, Se/H, Hg, Se/Hg, H/Hg et H+Se/Hg après 21 jours de traitement. Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  SEM de 08 rats).

Les paramètres	Les lots expérimentaux							
	Témoin	Se	H	H+Se	Hg	Se+Hg	H+Hg	H+Se+Hg
SOD (U/mg prot)	0,43 $\pm$ 0,06	0,44 $\pm$ 0,01	0,46 $\pm$ 0,04	0,45 $\pm$ 0,03	0,2 $\pm$ 0,02 <sup>a3</sup>	0,30 $\pm$ 0,03 <sup>a2b3</sup>	0,34 $\pm$ 0,02 <sup>a1b3</sup>	0,39 $\pm$ 0,01 <sup>b3</sup>
GPx ( $\mu$ mol/min/mg prot)	0,036 $\pm$ 0,002	0,036 $\pm$ 0,005	0,034 $\pm$ 0,006	0,035 $\pm$ 0,005	0,021 $\pm$ 0,001 <sup>a3</sup>	0,024 $\pm$ 0,002 <sup>a1b3</sup>	0,03 $\pm$ 0,004 <sup>a2</sup>	0,032 $\pm$ 0,005 <sup>b3</sup>
GST (nmol/min/mg prot)	0,0069 $\pm$ 0,0001	0,007 $\pm$ 0,0006	0,007 $\pm$ 0,0005	0,0066 $\pm$ 0,0004	0,0039 $\pm$ 0,0003 <sup>a3</sup>	0,005 $\pm$ 0,0002 <sup>a2</sup>	0,0057 $\pm$ 0,0003 <sup>a2</sup>	0,006 $\pm$ 0,0004 <sup>b2</sup>
Catalase ( $\mu$ mol/min/mg prot)	253,42 $\pm$ 10	259,3 $\pm$ 8,8	253,3 $\pm$ 8,1	259,8 $\pm$ 7,1	160,31 $\pm$ 6,3 <sup>a3</sup>	243,34 $\pm$ 11 <sup>b3</sup>	247,08 $\pm$ 7,1 <sup>b3</sup>	250,1 $\pm$ 8,2 <sup>b3</sup>

**a1 :** Différence significative comparant au témoin (P $\leq$  0,05). **a2 :** Différence hautement significative comparant au témoin (P $\leq$  0,01). **a3 :** Différence très hautement significative comparant au témoin (P $\leq$  0,001).

**b1 :** Différence significative comparant au lot traité par chlorure de mercure (P $\leq$  0,05). **b2 :** Différence hautement significative comparant au lot traité par le chlorure de mercure (P $\leq$ 0,01). **b3 :** Différence très hautement significative comparant au lot traité par le chlorure de mercure (P $\leq$ 0,001). **P :** seuil de signification.







Thèse Présentée en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat en sciences  
Option : Biochimie Appliquée

**Intitulé :** L'effet protecteur des antioxydants naturels dans l'intoxication du mercure chez le rat *Albinos Wistar* (Aspects biochimiques, immunologiques et histologiques).

**Résumé :** La présente étude visait à évaluer l'effet protecteur de l'huile d'argan et du sélénium contre le stress oxydatif induit par le mercure. Pour cette raison, une étude phytochimique des testés antioxydant in vitro ont été réalisés sur l'huile d'argan pour estimer ses effets attendus. Les résultats ont montré la présence des composés phénoliques à une concentration très importante. L'évaluation du pouvoir piégeur de l'huile d'argan est plus active avec une  $IC_{50}=13.33 \pm 1.3$ , et in vivo, sur des rats *Albinos Wistar* qui sont traités par le mercure seul ou combiné avec l'huile d'argan et le sélénium, pendant une période de trois semaines, le sang est prélevé ensuite les rats sont sacrifiés et les différents paramètres sont déterminés. À partir de l'analyse de nos résultats, on observe une diminution considérable du gain de poids durant le traitement au mercure seul ou combiné avec l'huile d'argan et le sélénium, mais aucune variation claire du poids relatif du foie, du rein ou de la rate n'a été obtenue. Les résultats ont montré aussi des changements notables dans les paramètres biochimiques, immunologiques et hématologiques. Caractérisés surtout, par une augmentation significative de la concentration sérique du glucose, urée, créatinine, acide urique, bilirubine totale et directe, les lipides totaux, cholestérol, triglycéride, les diènes conjugués et l'activité enzymatique de AST, ALT, PAL et LDH. Alors que, la concentration sérique de l'albumine et les protéines totales ont été diminuées chez les rats traités au mercure par rapport aux animaux témoins. Les résultats révèlent également une toxicité immunologique et hématologique en particulier chez les lots traités au mercure seul, une augmentation sérique de IL1, IL6 et TNF $\alpha$  et élévation du nombre des globules blancs, une diminution du taux des globules rouges, de la concentration d'hémoglobine, le pourcentage de l'hématocrite et l'activité phagocytaire pendant le traitement par le mercure. Ainsi le traitement des rats par le mercure entraîne une diminution dans la capacité anti-oxydante plasmatique caractérisée par la diminution de la concentration sérique de la vitamine E et C et du taux de DPPH et des thiols. Nous avons également observé que les résultats obtenus mettent en évidence le potentiel détoxifiant exprimé par la diminution des taux de glutathion érythrocytaire, hépatique et rénale, les métallothionéine, l'activité enzymatique du système anti-oxydant SOD, GPx, GST et catalase et une augmentation dans la peroxydation lipidique exprimée par le taux élevé de MDA plasmatique, érythrocytaire, hépatique et rénale. Aussi les résultats ont montré clairement des altérations de substance des tissus étudiés en comparaison avec les témoins, avec des cytolyses hépatocytaires, nécrose hépatique et dégénérescences tubulaires avec nécrose des reins. Par ailleurs la supplémentation de l'huile d'argan et du sélénium a modifié les effets toxiques du mercure et diminué les altérations histologiques et montré que les deux antioxydants sont efficaces contre le stress oxydant induit par le mercure.

**Mots clés :** Mercure, Huile d'argan, Sélénium, Stress oxydatif, *Argania Spinosa*, antioxydants.