

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
REPUBLICUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

جامعة باجي مختار- عنابة

UNIVERSITE BADJI MOKHTAR - ANNABA

FACULTE DES SCIENCES  
DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE



# THÈSE

En vue de l'obtention du diplôme de DOCTORAT

En Biochimie

Option : Biochimie appliquée

**ETUDE DE L'EFFET COMBINÉ DE LA VITAMINE E  
ET DU SÉLÉNIUM CONTRE LA TOXICITÉ DU  
NITRATE D'ARGENT CHEZ LE RAT DE LA SOUCHE  
WISTAR**

Présentée par : GUEROUI Mouna

Directeur de thèse : Pr KECHRID Zine

Professeur, Université d'Annaba

Membres de Jury :

Président : Pr BOUZERNA Noureddine

Professeur, Université d'Annaba

Examineur : Pr MESSARAH Mahfoud

Professeur, Université d'Annaba

Examineur : Pr ATTALAH Salah

Professeur, Université de Constantine

Année universitaire : 2015-2016

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

« يَا أَيُّهَا الَّذِينَ آمَنُوا إِذَا قِيلَ لَكُمْ تَفَسَّحُوا فِي الْمَجَالِسِ فَافْسَحُوا يَفْسَحِ اللَّهُ لَكُمْ وَإِذَا قِيلَ  
انشُرُوا فَانشُرُوا يَرْفَعِ اللَّهُ الَّذِينَ آمَنُوا مِنْكُمْ وَالَّذِينَ أُوتُوا الْعِلْمَ دَرَجَاتٍ وَاللَّهُ بِمَا تَعْمَلُونَ خَبِيرٌ »

صدق الله العظيم [سورة المجادلة: الآية 11]

## ***Remerciements***

*Premièrement, je remercie **ALLAH** ﷻ, le bon Dieu, qui m'a donné l'ambitieux, le défi, la santé et le courage pour terminer cette thèse.*

*Deuxièmement, je tiens à présenter mes sincères remerciements à **Mr Zine KECHRID**, Professeur à l'université d'Annaba pour la confiance qu'il m'a témoigné en acceptant de diriger et encadrer les travaux de cette thèse. Je lui réitère ici mes remerciements les plus vifs pour sa patience, son aide et ses directives.*

*Je remercie également **Mr Noureddine BOUZERNA**, Professeur à l'université d'Annaba pour le grand honneur qu'il me fait en présidant ce jury.*

*Je remercie vivement **Mr Mahfoud MESSARAH**, Professeur à l'université d'Annaba qui me fait l'honneur d'évaluer cette thèse en tant qu'un examinateur.*

*Toute ma gratitude pour le déplacement et mes vifs remerciements au **Mr Salah ATTALAH**, Professeur de l'université de Constantine pour l'honneur qu'il me fait en acceptant de juger ce travail.*

*Je dédie cette thèse à.....*

***la mémoire de mon Père***

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

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

***ma très chère mère***

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

*Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que tu mérites pour tous les sacrifices que tu n'as cessé de me donner depuis ma naissance, durant mon enfance et même à l'âge adulte.*

*Tu as fait plus qu'une mère puisse faire pour que ses enfants suivent le bon chemin dans leur vie et leurs études.*

*Je te dédie ce travail en témoignage de mon profond amour. Puisse Dieu, le tout puissant, te préserver et t'accorder santé, longue vie et bonheur.*

***mes très chères sœurs Hakima et Habiba***

*En témoignage de l'attachement, de l'amour et de l'affection que je porte pour vous.*

*Je vous souhaite un avenir plein de joie, de bonheur, de réussite et de sérénité.  
Je vous exprime à travers ce travail mes sentiments de fraternité et d'amour.*

## ***Activités scientifiques***

### **Communications affichées**

- ✚ Mai 2016 : Journées nationales d'Urologie d'Annaba – Faculté de Médecine. Annaba. Algérie.
- ✚ Octobre 2015 : Société Algérienne de Nutrition – Alger. Algérie.
- ✚ Octobre 2014 : 2<sup>ème</sup> congrès international – Santé au Naturel, Université Abdelhamid Ibn Badis. Mostaganem. Algérie.
- ✚ Mai 2014 : 2<sup>ème</sup> journée de Pharmacie – Faculté de Médecine. Annaba, Algérie.
- ✚ Avril 2014 : Journées Scientifiques organisées à l'occasion de la commémoration du 40<sup>ème</sup> Anniversaire de la Création de l'USTHB – Département des sciences et de technologie, Université Houari Boumediene, Alger, Algérie.
- ✚ Mars 2014 : 25<sup>ème</sup> Congrès de l'Association Tunisienne des Sciences Biologiques (ATSB) – Association tunisienne des sciences biologiques, Tunis, Tunisie.
- ✚ Mai 2013 : Participation à la 6<sup>ème</sup> journée de méthodologie en recherche clinique «Maitrise de la clinimétrie et bonnes pratiques cliniques» – Unité d'épidémiologie clinique d'Annaba-RECIF.
- ✚ Avril 2013 : 4<sup>ème</sup> Congrès de Biologie clinique et 5<sup>ème</sup> Journées Francophones de Médecine de Laboratoire – Société Algérienne de Biologie Clinique, Alger, Algérie.

### **Publications internationales**

- ✚ Effect of the Joint Supplementation of Vitamin E and Selenium on Chronic Silver Induced Liver Injury in Male (Wistar) Albino Rats  
International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research. 34(2) : 176-182.
- ✚ Evaluation of some biochemical parameters and brain oxidative stress in experimental rats exposed chronically to silver nitrate and the protective role of vitamin E and selenium  
Toxicological Research. 32(4) : 1-9.

# TABLE DES MATIÈRES

## LISTE DES FIGURES

## LISTE DES TABLEAUX

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

## RÉSUMÉS

## INTRODUCTION ..... 1

## ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

### CHAPITRE I : L'ARGENT

#### 1. Propriétés physicochimiques..... 3

##### 1.1. Propriétés physiques ..... 3

##### 1.2. L'atome et ses ions..... 3

##### 1.3. Propriétés chimiques et sels d'argent ..... 3

#### 2. Sources ..... 4

#### 3. Applications ..... 5

##### 3.1. Un puissant agent antimicrobien ..... 5

##### 3.2. Application dans l'industrie ..... 6

#### 4. Les nanoparticules d'argent ..... 6

#### 5. Toxicité ..... 7

##### 5.1. Toxicocinétique ..... 7

###### 5.1.1. Absorption ..... 7

###### 5.1.2. Distribution ..... 8

###### 5.1.3. Métabolisme ..... 9

###### 5.1.4. Excrétion ..... 10

###### 5.1.5. Demi-vie biologique..... 10

##### 5.2. Toxicité par voie d'administration ..... 11

###### 5.2.1. Voie orale ..... 11

###### 5.2.2. Voie respiratoire ..... 16

###### 5.2.3. Voie cutanée ..... 18

#### 6. Effets sur l'environnement et exposition humaine ..... 19

### CHAPITRE II : LE STRESS OXYDATIF

#### 1. Le paradoxe d'oxygène ..... 21

#### 2. Le stress oxydant ..... 21

2.1. Définition et facteurs déclenchant .....	21
2.2. Les radicaux libres (RL) .....	22
2.2.1. Définition .....	22
2.2.2. Types et sources.....	22
2.2.3. Physiologie .....	26
2.3. Systèmes de défense antioxydant .....	30
2.3.1. Les antioxydants plus que des piègeurs d'ERO .....	31
2.3.2. Les antioxydants comme agents de prévention .....	31
2.3.3. Système enzymatique.....	31
2.3.4. Système non enzymatique.....	34
2.4. Stress oxydant et transmission cellulaire.....	38
2.4.1. Les facteurs de transcription activés par le stress oxydant.....	38
2.4.2. Facteurs de transcription inhibés par le stress oxydant .....	39
2.5. Conséquences physiopathologiques .....	39
2.5.1. Théorie radicalaire du vieillissement.....	39
2.5.2. Pathologies chroniques liées à un excès d'ERO.....	40
<b>CHAPITRE III : LA VITAMINE E ET LE SELENIUM</b>	
1. La vitamine E .....	42
1.1. Historique .....	42
1.2. Structure chimique.....	42
1.3. Biosynthèse, sources alimentaires et utilisations.....	43
1.3.1. Biosynthèse .....	43
1.3.2. Sources alimentaires et besoin.....	43
1.3. Utilisations.....	44
1.4. Absorption et répartition dans l'organisme .....	44
1.5. Activité biologique et activité antioxydante .....	45
1.5.1. Activité antioxydante.....	45
1.5.2. Activité stabilisatrice de membrane.....	45
1.5.3. Activités liées aux plaquettes et aux globules rouges.....	45
1.5.4. Action sur la croissance et la différenciation cellulaire.....	46
1.5.5. Vitamine E et fonction neurologique.....	46
1.5.6. Vitamine E et fonction immunitaire .....	46
1.6. Carences .....	46
2. Le sélénium .....	47

2.1. Historique .....	47
2.2. Présentation chimique.....	47
2.3. Sources, besoins et utilisations .....	47
2.3.1. Sources.....	47
2.3.2. Besoins.....	49
2.3.2. Utilisations.....	49
2.4. Absorption et répartition dans l'organisme .....	49
2.5. Effets bénéfiques .....	49
2.5.1. Activité antioxydante.....	49
2.5.2. Sélénium et maladies cardiovasculaires .....	50
2.5.3. Sélénium et système nerveux.....	50
2.5.4. Sélénium et problèmes liés au tube digestif et à la thyroïde.....	50
2.5.5. Sélénium et immunité .....	50
2.5.6. Potentialité thérapeutique anticancéreuse du sélénium .....	51
2.5.7. Autres effets bénéfiques .....	51

## **ETUDE EXPÉRIMENTALE**

### **CHAPITRE I : MATÉRIELS ET MÉTHODES**

1. Matériel biologique .....	52
1.1. Animaux d'élevage.....	52
1.2. Enceinte d'élevage.....	52
2. Protocole expérimental.....	52
3. Sacrifice des animaux.....	53
3.1. Prélèvement sanguin.....	53
3.2. Dissection et prélèvement des organes .....	54
4. Méthodes d'analyses biochimiques.....	56
4.1. Dosage du glucose .....	56
4.2. Dosage de l'aspartate amino-transférase (ASAT) .....	56
4.3. Dosage de l'alanine amino-transférase (ALAT) .....	56
4.4. Dosage de lactate déshydrogénase .....	57
4.5. Dosage de la phosphatase alcaline (PAL) .....	57
4.6. Dosage de la bilirubine directe .....	57
4.7. Dosage des protéines totales .....	57
4.8. Dosage de l'albumine .....	58
4.9. Dosage du cholestérol .....	58

4.10. Dosage des triglycérides .....	58
4.11. Dosage des lipides totaux .....	59
4.12. Dosage de créatinine .....	59
4.13. Dosage de l'urée .....	59
4.14. Dosage de l'acide urique .....	59
4.15. Dosage de la lipase .....	60
4.16. Dosage d' $\alpha$ -Amylase (AMS) .....	60
4.17. Dosage de calcium .....	60
4.18. Dosage de phosphore .....	60
5. Méthodes de détermination quantitative des marqueurs biologiques de stress oxydant .....	61
5.1. Dosage des protéines tissulaires .....	61
5.2. Dosage de GSH tissulaire .....	61
5.3. Dosage de TBARS .....	62
5.4. Détermination d'activité enzymatique de la GSH-Px .....	63
5.5. Détermination d'activité enzymatique de la GST .....	64
5.6. Détermination d'activité enzymatique de la GR .....	65
5.7. Détermination d'activité enzymatique de la SOD .....	67
5.8. Détermination de l'activité enzymatique CAT .....	68
5.9. Dosage de la vitamine E .....	69
6. Technique histologique .....	71
7. Étude statistique .....	72
<b>CHAPITRE II : RESULTATS ET DISCUSSION</b>	
1. Évaluation de la variation du poids corporel, poids des organes et consommation journalière en eau et en aliment .....	73
2. Évaluation de l'examen hématologique .....	79
3. Explorations biochimiques .....	85
4. Dépistage d'une hépatotoxicité et appréciation de l'activité antioxydante de la vitamine E et du sélénium .....	98
5. Effet d'argent sur le tissu rénal et évaluation du traitement par la vitamine E et le sélénium .....	108
6. Effet d'argent sur le tissu testiculaire et évaluation du traitement par la vitamine E et le sélénium .....	118
7. Evaluation de la neurotoxicité induite par l'argent et effet protecteur de la vitamine E et du sélénium .....	121

**CONCLUSION ET PERSPECTIVES ..... 130**

**RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

**ANNEXES**

**PUBLICATIONS**





## LISTE DES FIGURES

Figure	Titre	Page
1	Résumé des transformations biologiques des ions d'argent dès l'absorption jusqu'à l'excrétion et formation des dépôts d'argyrie	11
2	Photo d'une patiente à l'âge de 36 ans avec une coloration grise caractérisant le visage et le cou. La photo a été prise en 1978	14
3	Production des antioxydants et des radicaux libres durant (A) des conditions normales et (B) un stress oxydant	21
4	Chaîne de transport des électrons mitochondriale et sites de production d'O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	24
5	La double vie des ERO	27
6	Mécanisme en chaîne de la peroxydation des acides gras polyinsaturés et nature des produits terminaux formés	28
7	Nature de quelques modifications des chaînes latérales d'acides aminés des protéines après attaque radicalaire	29
8	Lésions de l'ADN formées par attaque radicalaire du patrimoine génétique des cellules	30
9	Les réactions impliquant le glutathion	36
10	Les antioxydants	38
11	Rôle central des espèces oxygénées activées et du glutathion dans la régulation rédox de la transcription des gènes	39
12	Surproduction des radicaux libres provoque un stress oxydant affectant différents organes ou systèmes	41
13	Structure et nomenclature de la vitamine E	42
14	Les principales étapes de la biosynthèse de la vitamine E	43
15	Représentation de l'absorption de sélénium, synthèse des sélénoprotéines P et distribution dans les différents organes	49
16	Illustration schématique de l'expérimentation	55
17	Principe de la méthode d'Ellman	62
18	Principe de dosage de MDA	63
19	Principe de dosage de GST	65
20	Réaction d'oxydoréduction catalysée par GR	66
21	Oxydation de l'adrénaline en adrénochrome via l'anion superoxyde	67
22	Consommation d'eau de boisson après 3 mois de traitement chez le lot témoin et les lots traités	74
23	Consommation d'aliment (g/rat/jour) chez le lot témoin et les lots traités	74

24	Variation de la masse relative du foie chez le lot témoin et les lots traités	75
25	Variation de la masse relative des reins chez le lot témoin et les lots traités	76
26	Variation de la masse relative de cerveau chez le lot témoin et les lots traités	76
27	Variation de la masse relative des testicules chez le lot témoin et les lots traités	77
28	Détermination quantitative des érythrocytes chez le lot témoin et les lots traités	79
29	Détermination de l'hématocrite en pourcentage chez le lot témoin et les lots traités	80
30	Taux d'hémoglobine chez le lot témoin et les lots traités	80
31	Détermination quantitative des leucocytes chez le lot témoin et les lots traités	81
32	Détermination quantitative des plaquettes chez le lot témoin et les lots traités	81
33	Variation de la glycémie chez le lot témoin et les lots traités	85
34	Variation de l'activité enzymatique ASAT chez le lot témoin et les lots traités	86
35	Variation de l'activité enzymatique ALAT chez le lot témoin et les lots traités	86
36	Variation de l'activité enzymatique PAL chez le lot témoin et les lots traités	87
37	Variation de la concentration sérique de la bilirubine directe chez le lot témoin et les lots traités	87
38	Variation de l'activité enzymatique LDH chez le lot témoin et les lots traités	88
39	Variation de la concentration sérique des protéines totales chez le lot témoin et les lots traités	88
40	Variation de la concentration sérique de l'albumine chez le lot témoin et les lots traités	89
41	Variation de la cholestérolémie chez le lot témoin et les lots traités	89
42	Variation de la concentration sérique des triglycérides chez le lot témoin et les lots traités	90
43	Variation de la concentration sérique des lipides totaux chez le lot témoin et les lots traités	90
44	Variation de la créatinémie chez le lot témoin et les lots traités	91
45	Variation de l'urémie chez le lot témoin et les lots traités	91
46	Variation de la concentration sérique de l'acide urique chez le lot témoin et les lots traités	91
47	Variation de l'activité enzymatique de la lipase chez le lot témoin et les lots traités	92
48	Variation de l'activité enzymatique $\alpha$ -Amylase chez le lot témoin et les lots traités	92
49	Variation de la calcémie chez le lot témoin et les lots traités	93

49	Variation de la phosphorémie chez le lot témoin et les lots traités	93
51	Variation de teneur hépatique en TBARS chez le lot témoin et les lots traités	98
52	Variation de teneur hépatique en GSH chez le lot témoin et les lots traités	99
53	Variation de teneur hépatique en vitamine E chez le lot témoin et les lots traités	99
54	Variation de l'activité enzymatique GSH-Px dans le foie chez le lot témoin et les lots traités	100
55	Variation de l'activité enzymatique GST dans le foie chez le lot témoin et les lots traités	100
56	Variation de l'activité enzymatique GR dans le foie chez le lot témoin et les lots traités	101
57	Variation de l'activité enzymatique SOD dans le foie chez le témoin et les lots traités	101
58	Effet d'argent sur l'histologie du tissu hépatique sous microscope optique. Témoins (A1×250, A2×400), traité par Ag (B1×250, B2×400). Coloration éosine hématoxyline	104
59	Effet de supplémentation du vitamine E et/ou sélénium sur l'histologie du foie sous microscope optique. Ag + vit E (C×250), Ag + Se (D×250), and Ag + vit E + Se (E1×100, E2×250). Coloration éosine hématoxyline	105
60	Variation de teneur rénale en TBARS chez le lot témoin et les lots traités	108
61	Variation de teneur rénale en GSH chez le lot témoin et les lots traités	109
62	Variation de teneur rénale en vitamine E chez le lot témoin et les lots traités	109
63	Variation de l'activité enzymatique GSH-Px dans les reins chez le lot témoin et les lots traités	110
64	Variation de l'activité enzymatique GST dans les reins chez le lot témoins et les lots traités	110
65	Variation de l'activité enzymatique GR dans les reins chez le lot témoin et les lots traités	111
66	Variation de l'activité enzymatique SOD dans les reins chez le lot témoin et les lots traités	111
67	Effet d'argent et de supplémentation du vitamine E et/ou sélénium sur l'histologie des reins sous microscope optique. Témoins (A), Ag (B), Ag + vit E (C), Ag + Se (D), and Ag + vit E + Se (E). Coloration éosine hématoxyline (×40)	112
68	Variation de teneur testiculaire en TBARS chez le lot témoin et les lots traités	115
69	Variation de teneur testiculaire en GSH chez le lot témoin et les lots traités	116
70	Variation de teneur testiculaire en vitamine E chez le lot témoin et les lots traités	116

71	Variation de l'activité enzymatique GSH-Px dans les testicules chez le lot témoin et les lots traités	117
72	Variation de l'activité enzymatique GST dans les testicules chez le lot témoin et les lots traités	118
73	Variation de l'activité enzymatique GR dans les testicules chez le lot témoin et les lots traités	118
74	Variation de l'activité enzymatique SOD dans les testicules chez le lot témoin et les lots traités	119
75	Variation de l'activité enzymatique CAT dans les testicules chez le lot témoin et les lots traités	119
76	Effet d'argent et de supplémentation du vitamine E et/ou sélénium sur l'histologie des testicules sous microscope optique. Témoins (A), Ag (B), Ag + vit E (C), Ag + Se (D), and Ag + vit E + Se (E). Coloration éosine hématoxyline (×40)	120
77	Variation de teneur cérébrale en TBARS chez le lot témoin et les lots traités	122
78	Variation de teneur cérébrale en GSH chez le lot témoin et les lots traités	123
79	Variation de teneur testiculaire en vitamine E chez le lot témoin et les lots traités	123
80	Variation de l'activité enzymatique GSH-Px dans le cerveau chez le lot témoin et les lots traités	124
81	Variation de l'activité enzymatique GST dans les testicules chez le lot témoin et les lots traités	125
82	Variation de l'activité enzymatique GR dans les testicules chez le lot témoin et les lots traités	125
83	Variation de l'activité enzymatique SOD dans les testicules chez le lot témoin et les lots traités	126
84	Variation de l'activité enzymatique CAT dans les testicules chez le lot témoin et les lots traités	126
85	Effet d'argent et de supplémentation du vitamine E et/ou sélénium sur l'histologie de cerveau sous microscope optique. Témoins (A), Ag (B), Ag + vit E (C), Ag + Se (D), and Ag + vit E + Se (E). Coloration éosine hématoxyline (×40)	127

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Titre	Page
1	Propriétés physico-chimiques d'argent et de quelques sels d'argent	02
2	Différentes utilisations d'argent métallique et des composés d'argent	06
3	Dose létale et dose létale médiane	12
4	Quelques patients et rats expérimentaux souffrent de l'argyrie et/ou l'argyrose après ingestion d'Ag ou ses composés	15
5	Facteurs déclenchant le stress oxydant	22
6	Biomarqueurs de stress oxydant associés à des pathologies	40
7	Teneur relative en vitamine E (mg acétate $\alpha$ -tocophérol (UI)/100 g) des différentes sources naturelles	44
8	Allocation diététique recommandée et apport maximal tolérable en sélénium	48
9	Composition du régime alimentaire utilisé lors de l'expérimentation selon (Upreti <i>et al.</i> , 1989)	54
10	Changement du poids corporel au cours de l'expérience	73
11	Variation du poids absolu du foie, reins, cerveau et testicules au cours de l'expérience	75
12	Variation des autres paramètres de l'hémogramme	82

## **LISTE DES ABRÉVIATIONS**

<b>ADHD</b>	<b>Attention Deficit Hyperactivity Disorder</b>
<b>AGE</b>	<b>Advanced Glycation Endproducts</b>
<b>AGPI</b>	<b>Acides Gras Polyinsaturés</b>
<b>AgNPs</b>	<b>Nanoparticules d'argent</b>
<b>AMS</b>	<b><math>\alpha</math>-Amylase</b>
<b>AP</b>	<b>Activator Protein</b>
<b>ARDS</b>	<b>Acute Respiratory Distress Syndrome</b>
<b>BBC</b>	<b>Bleu Brillant de Coomassie G 250</b>
<b>CCMH</b>	<b>Concentration Corpusculaire Moyenne en Hémoglobine</b>
<b>CDNB</b>	<b>1-Chloro-2,4-dinitrobenzène</b>
<b>CHD</b>	<b>Coronary Heart Disease</b>
<b>CMV</b>	<b>Compléments Minéraux et Vitaminiques</b>
<b>CNP</b>	<b>2-Chloro-4-nitrophénol</b>
<b>CNPG2</b>	<b>2-Chloro-4-nitrophényl-<math>\alpha</math>-D-maltoside</b>
<b>CNPG3</b>	<b>2-Chloro-4-nitrophényl-<math>\alpha</math>-D-maltotrioside</b>
<b>COPD</b>	<b>Chronic Obstructive Pulmonary Disease</b>
<b>CSF</b>	<b>Chronic Fatigue Syndrome</b>
<b>DCPS</b>	<b>2-4 Dichlorophénol-sulfonate</b>
<b>DMSO</b>	<b>Diméthyl Sulfoxyde</b>
<b>DOPA</b>	<b>3,4-Dihydroxyphénylalanine</b>
<b>DRI</b>	<b>Dietary Reference Intake</b>
<b>DTNB</b>	<b>Acide 5,5' dithiodis-2-nitrobenzoïque</b>
<b>EDTA</b>	<b>Éthylène Diamine Tétra-Acétique</b>
<b>ERO</b>	<b>Espèces réactives de l'oxygène</b>
<b>FAD</b>	<b>Flavine Adénine Dinucléotide</b>
<b>FADH<sub>2</sub></b>	<b>Flavine Adénine Dinucléotide réduit</b>
<b>FMNH<sub>2</sub></b>	<b>Flavine Mononucléotide réduite</b>
<b>FNB</b>	<b>Food National Academies Board</b>
<b><math>\gamma</math>-GCS</b>	<b><math>\gamma</math> Glutamyl Cystéine Synthétase</b>
<b>GMPc</b>	<b>Guanosine Mono Phosphate cyclique</b>
<b>GOT</b>	<b>Glutamo Oxaloacétique Transaminase</b>

<b>GPT</b>	<b>Glutamo Pyruvique Transaminase</b>
<b>GPO</b>	<b>Glycérol-3-phosphate oxydase</b>
<b>Grx</b>	<b>Glutaredoxines</b>
<b>GS</b>	<b>GSH Synthétase</b>
<b>G3P</b>	<b>Glycérol-3-phosphate</b>
<b>HO</b>	<b>Hème oxygénase</b>
<b>HSF</b>	<b>Heat Shock Factor</b>
<b>IκBα</b>	<b>Inhibiteur de NFκB</b>
<b>IL-8</b>	<b>Interleukine 8</b>
<b>IL-1β</b>	<b>Interleukine-1beta</b>
<b>iNOS</b>	<b>inducible Nitric Oxide Synthase</b>
<b>IR</b>	<b>Ischémie Reperfusion</b>
<b>JNK</b>	<b>Jun kinases</b>
<b>LPL</b>	<b>Lipoprotéine-lipase</b>
<b>MDA</b>	<b>Malondialdéhydes</b>
<b>MDH</b>	<b>Malate Déshydrogénase</b>
<b>MTF</b>	<b>Metal-responsive transcription factor</b>
<b>NAA</b>	<b>Neutron Activation Analysis</b>
<b>NADH</b>	<b>Nicotinamide Adenine Dinucleotide</b>
<b>NADPH</b>	<b>Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate</b>
<b>NAG</b>	<b>N-acétyl-B-D-glucosaminidase</b>
<b>NFI</b>	<b>Nuclear Factor 1</b>
<b>NF-κB</b>	<b>Nuclear Factor κB</b>
<b>NFS</b>	<b>Numération-Formule Sanguine</b>
<b>NK</b>	<b>Natural Killer</b>
<b>NOS</b>	<b>NO Synthase</b>
<b>NOX</b>	<b>NADPH Oxydase</b>
<b>OCD</b>	<b>Obsessive-Compulsive Disorder</b>
<b>PH-GSH-Px</b>	<b>Phospholipide hydroperoxyde Peroxydase</b>
<b>POD</b>	<b>Peroxydase</b>
<b>p53</b>	<b>protéine 53</b>
<b>RL</b>	<b>Radicaux Libres</b>

<b>RNS</b>	<b>Reactive Nitrogen Species</b>
<b>ROS</b>	<b>Reactive Oxygen Species</b>
<b>Sp-1</b>	<b>Specificity protein 1</b>
<b>Srx</b>	<b>Sulphiredoxines</b>
<b>TBA</b>	<b>Thiobarbituric Acid</b>
<b>TBARS</b>	<b>Thiobarbituric Acid Reacting Substances</b>
<b>TBS</b>	<b>Tris Buffered Saline</b>
<b>TCMH</b>	<b>Teneur Corpusculaire Moyenne en Hémoglobine</b>
<b><math>\alpha</math>-TE</b>	<b><math>\alpha</math>-tocophérol équivalent</b>
<b>TNB</b>	<b>Acide thionitrobenzoïque</b>
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	<b>Tumor Necrosis Factor-<math>\alpha</math></b>
<b>TOOS</b>	<b>N-ethyl-N-(2-hydroxy-3-sulfopropyl)-m-toluidine</b>
<b>TRIS</b>	<b>Trishydroxyméthylaminométhane</b>
<b>TrxR</b>	<b>Thiorédoxine Réductase</b>
<b>U.S. EPA</b>	<b>US. Agence de protection environnementale</b>
<b>VMC</b>	<b>Volume Moyen Corpusculaire</b>
<b>VMP</b>	<b>Volume Moyen Plaquettaire</b>
<b>4HDA</b>	<b>4Hydroxyalkénal</b>
<b>4-HNE</b>	<b>4-Hydroxy-2-nonenal</b>

# ***RÉSUMÉS***

## RÉSUMÉ

L'objectif de ce travail est d'étudier les effets éventuellement protecteurs de sélénium et de la vitamine E séparément ou en combinaison sur certains paramètres, inclus les paramètres biochimiques et hématologiques, ainsi que sur quelques paramètres de stress oxydatif et aussi l'histopathologie du foie, des reins, de cerveau et des testicules chez des rats traités chroniquement par nitrate d'argent 20 mg/L durant une période de trois mois.

D'après les résultats obtenus, une élévation des activités sériques du lactate déshydrogénase (LDH) et de la lipase et de la teneur sérique en cholestérol ainsi qu'une réduction en protéines totales, en calcium et en activité sérique de la phosphatase alcaline (PAL) ont été remarquées chez les rats traités par Ag. De plus, l'estimation de l'étude hématologique a révélé une augmentation du nombre des globules rouges.

Ainsi, les résultats ont montré que les ions  $Ag^+$  ont affecté le système de défense antioxydant en entraînant une diminution de l'activité superoxyde dismutase (SOD) hépatique et neurale et une élévation du concentration de la vitamine E aussi dans le foie et le cerveau. Une chute du glutathion réduit (GSH) rénal et du glutathion réductase (GR) testiculaire ainsi qu'une élévation de l'activité du glutathion S-transférase (GST) testiculaire sont aussi remarquées.

Par ailleurs, une augmentation notable de MDA (malondialdéhyde) dans le tissu cérébral résultant d'un état de peroxydation lipidique a été trouvée. L'étude histologique a exhibé quelques altérations du tissu hépatique inclus la dilatation sinusoidale et vénale, l'accumulation des érythrocytes et l'arrangement irrégulier des hépatocytes; par ailleurs, le tissu nerveux a présenté un certain désordre citant une hémorragie et une vacuolisation. Toutefois, le traitement par la vitamine E et/ou le sélénium a prouvé le rôle défenseur vis-à-vis les effets néfastes d'argent sur les paramètres mentionnés précédemment. Ce rôle est lié au type de paramètre lui-même et à la nature d'organe.

En conclusion, dépendant à la dose et à la durée d'exposition à l' $AgNO_3$  dans cette étude, l'argent pourrait causer des effets nuisibles dans le corps animal dont le cerveau est apparu le tissu le plus affecté; ces effets peuvent être plus toxiques en cas des concentrations plus importantes ou après longue période d'exposition. Au contraire, le sélénium et la vitamine E servent comme des antioxydants puissants pouvant exercer des effets adversaires contre ces effets toxiques.

Mots clés: argent, vitamine E, sélénium, stress oxydatif, rats.

## ABSTRACT

This study was carried out to investigate the possible protective effect of both vitamin E and selenium separately or in combination on certain biochemical, hematological and some oxidative stress parameters with histopathological examination of liver, kidneys, brain and testis of rats chronically treated by silver nitrate 20 mg/l for three months.

According to the results which have been obtained; there was an increase in serum lactate dehydrogenase (LDH), lipase activities and cholesterol level, a decrease in serum total protein, calcium and alkaline phosphatase (ALP) activity in Ag-intoxicated rats. Moreover the hematology estimation revealed that there was an increase in red blood counts.

Thus, the findings showed that  $\text{Ag}^+$  ions affected antioxidant defense system by decreasing hepatic and neural superoxide dismutase (SOD) activity and increasing vitamin E concentration in liver and brain. A decline in renal reduced glutathione (GSH) and testes glutathione reductase (GR), and an increase in testes glutathione-S-transferase (GST) activities are too noticed. Beside a high level of MDA (malondialdehyde) in brain tissue, this was recognized as a result of lipid peroxidation. The histological examination exhibited also some hepatic alterations including sinusoidal and venal dilatation, erythrocytes accumulation and irregular hepatocytes arrangement; furthermore, brain tissue presented some disorders as hemorrhage and cytoplasm vacuolization. However, treatment with vitamin E and/or selenium proved a defensive role on the toxicity effect of silver on the previous mentioned parameters. This role is reliant to the parameter itself and the nature of organ.

In conclusion, depending on the concentration and duration of exposure to  $\text{AgNO}_3$  in this study, silver could cause harmful effects in animal body. Whereas brain is appeared to be the most tissue affected; these effects can be more toxic in high concentrations or prolonged time exposure to this metal. In contrast, selenium and vitamin E act as powerful antioxidants which may exercise adverse effect against the toxicity of this metal.

Key words: silver, vitamin E, selenium, oxidative stress, rats.

## الملخص

يهدف هذا العمل إلى دراسة التأثير الوقائي المحتمل للسيلينيوم و الفيتامين E على حدى أو مجتمعين على بعض العوامل البيوكيميائية و على الصيغة الدموية، و كذا على المؤشرات الحيوية للإجهاد التأكسدي و التغيرات المرضية للأنسجة على مستوى الكبد، الكليتين، المخ و الخصيتين عند الفئران المعالجة بنترات الفضة بنسبة 20 ملغ/ل لمدة ثلاثة أشهر.

حسب النتائج المتحصل عليها، تم تسجيل ارتفاع في أنشطة بعض الإنزيمات مثل الإنزيم النازع لهيدروجين اللاكتات و الليباز وارتفاع في كولسترول الدم، و أيضا انخفاض على مستوى البروتينات الكلية، الكالسيوم و نشاط إنزيم الفوسفاتاز القلوي في مصل الدم لدى الفئران المعالجة بالفضة. كما أظهر فحص الدم زيادة في تعداد كريات الدم الحمراء في نفس المجموعة.

و قد أوضحت النتائج تأثير أيونات الفضة على مضادات الأكسدة، مؤدية إلى تدني نشاط إنزيم فوق أكسيد الدسموتاز الكبدي والعصبي، و رفع تركيز الفيتامين E أيضا على مستوى الكبد و الدماغ. بينما سجلنا هبوطا في نسبة الجلوتاثيون الكلوي ونشاط إنزيم جلوتاثيون المحتزل في الخصية، و كذا ارتفاع نشاط الإنزيم الناقل للجلوتاثيون في نفس العضو. إلى جانب ذلك، عرف النسيج الدماغى ارتفاعا ملحوظا لمؤشرات فوق الأكسدة الليبديدة. من ناحية أخرى، عكست دراسة التغيرات المرضية للأنسجة وجود بعض الاضطرابات على مستوى النسيج الكبدي كتمدد الجيببات و الأوردة، تراكم كريات الدم الحمراء و غياب التنظيم في تموضع الخلايا الكبدية. هذا و قد أبدى النسيج العصبي نوعا من الخلل مثل حدوث نزيف و ظهور فجوات على مستوى السيتوبلازم. كما أثبت العلاج بالفيتامين E و السيلينيوم دورهما الدفاعي ضد الآثار المضرة للفضة على المؤشرات المذكورة أعلاه، و يرتبط هذا الدور بنوع المؤشر و طبيعة العضو.

خلاصة، حسب الجرعة و مدة العلاج بنترات الفضة المستعملة في هذه الدراسة، نستنتج أن معدن الفضة يستطيع التسبب بآثار سلبية على جسم الحيوان حيث يعتبر الدماغ النسيج الأكثر تضررا. و قد تكون آثار هذا المعدن أكثر سمية عند التعرض لتراكيز أكثر أهمية أو خلال فترة أطول، لهذا يبرز دور كل من السيلينيوم و الفيتامين E كمضادات للأكسدة للوقاية من هذه الآثار السامة.

الكلمات الدالة: الفضة، الفيتامين E، السيلينيوم، الإجهاد التأكسدي، فئران.

# ***INTRODUCTION***

### INTRODUCTION

L'argent (Ag) est un élément chimique constitue l'un des métaux les plus anciennement connus. Il semble cependant que sa découverte soit postérieure à celle des deux autres métaux de la même famille chimique: l'or et le cuivre (Collongues, 1996), il est disséminé sur toute la surface de la terre, c'est un métal très rare, qui ne vient qu'au 63<sup>e</sup> rang dans l'ordre d'abondance des éléments de l'écorce terrestre, il existe aussi dans le sol, l'eau de mer, les eaux douces et l'air (Drake et Hazelwood, 2005; Lansdown, 2007). En raison de leur propriétés physico-chimiques, Ag est utilisé dans la fabrication des bijoux, des pièces de monnaies, des couverts, ainsi qu'en photographie et en médecine (Garnier, 2000; Reichl *et al.*, 2004; Lansdown, 2007; Hadrup et Lam, 2014).

L'argent n'as pas encore été identifié comme un métal de trace, il n'a aucun rôle physiologique dans le corps humain, cependant ce métal pourra être absorbé dans le corps à partir d'aliment, de l'eau de boisson et par inhalation, outre, de très faible concentrations d'argent présentent dans le sang ( $< 2.3 \mu\text{g/l}$ ) et dans quelques organes (foie, reins) (WHO, 1996; Lansdown, 2007; Hadrup et Lam, 2014). Comme une substance xénobiotique, l'argent présente un risque sur la santé des personnes exposées sous certaines circonstances (Pelkonen *et al.*, 2003; Reichl *et al.*, 2004). ). Le développement d'une pigmentation irréversible de la peau (argyrie) ou des yeux (argyrose) constitue la maladie provoquée par l'argent la plus connue (Lansdown, 2006; Atiyeh *et al.*, 2007). De plus, les atomes d'argent sous forme métallique s'ionisent dans le corps humain ou animal en présence des fluides corporels et des sécrétions, cette ionisation permet la libération des ions  $\text{Ag}^+$  biologiquement actifs en interagissant fortement avec les groupements sulfuriques et autres résidus anioniques des protéines, des membranes cellulaires et des débris tissulaires, parmi les conséquences de cette affinité est la dénaturation et l'inactivation des protéines et des enzymes essentiels inclus l'ARN polymérase et l'ADN polymérase ce qui est la base de l'action antimicrobienne de ce métal, mais ces interactions peuvent être aussi dommageables pour la cellule corporelle elle-même en cas de doses ou durées non conseillées (Lansdown, 2010<sup>a</sup>).

Similairement aux autres métaux de transition,  $\text{Ag}^+$  apparait affecter le statut oxydatif cellulaire (Baldi *et al.*, 1988). Le rôle des antioxydants endogènes et exogènes est de réduire les effets nocifs associés à l'exposition des métaux lourds, cela a été démontré par différentes expériences (Serafin Munoz *et al.*, 2007). Parmi ces antioxydants, nous tenons compte au sélénium dont la principale activité biologique est d'intervenir dans les résidus sélénocystéines présentant dans le site actif de certaines enzymes telles que la glutathion

peroxydase et la thiorédoxine réductase participant dans la protection contre le stress oxydatif. Un déficit pourra conduire au développement des cancers, des cardiomyopathies ainsi que des inflammations (Sochor *et al.*, 2012). Cet élément de trace est un antagoniste d'argent (Chow, 1990). Nous avons aussi intéressé à la vitamine E, premier antioxydant liposoluble jouant un rôle important dans l'élimination des radicaux oxygénés et dans la stabilisation des membranes cellulaires maintenant leur perméabilité (Ognjanovic *et al.*, 2003).

D'après la littérature, de très rares études sont consacrées aux effets adversaires de ces deux antioxydants à la fois vis-à-vis à la toxicité d'argent, ce qui a fait l'objectif de notre étude.

Afin de réaliser ce travail, nous avons dans un premier temps accédé à une synthèse bibliographique subdivisée à trois chapitres, le premier a traité des notions générales sur l'argent ainsi que des données toxicologiques. Alors que le deuxième a pris en considération le stress oxydatif incluant les radicaux libres, les dommages cellulaires et le système de défense antioxydant. Finalement, le troisième chapitre est intéressé aux  $\alpha$ -tocophérol et sélénium.

La deuxième partie est la partie expérimentale dans laquelle nous avons détaillé le protocole expérimental suivis, les différentes méthodes utilisées, les résultats obtenus et la discussion, les principales analyses effectuées dans ce travail sont les suivantes :

- ✓ la variation de poids corporel, des poids des organes, de la consommation quotidienne de l'eau de boisson et d'aliment;
- ✓ l'hémogramme;
- ✓ l'exploration biochimique;
- ✓ les biomarqueurs de stress oxydatif;
- ✓ l'examen histologique des organes.

***ETUDE***  
***BIBLIOGRAPHIQUE***

***CHAPITRE I***  
***L'ARGENT***

## 1. Propriétés physicochimiques

### 1.1. Propriétés physiques

L'argent est le plus blanc de tous les métaux, et après l'or, le plus malléable et le plus ductile. De tous les corps, c'est le meilleur conducteur de la chaleur et de l'électricité. De point de vue optique, il possède un pouvoir réflecteur très élevé dans l'infrarouge et sensiblement plus faible dans l'ultraviolet (UV), son pouvoir émissif est très faible, vraisemblablement l'un des plus bas de tous les éléments (Eisler, 1996; WHO 1996; Drake et Hazelwood, 2005).

### 1.2. L'atome et ses ions

L'argent possède deux isotopes stables,  $^{107}\text{Ag}$  et  $^{109}\text{Ag}$  et de nombreux isotopes radioactifs; le plus important est celui de nombre de masse 110. L'atome d'argent donne naissance à trois ions  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Ag}^{2+}$  et  $\text{Ag}^{3+}$ ,  $\text{Ag}^0$  constitue la forme métallique et non chargée de l'argent trouvé sous forme cristallisée (WHO, 2002; Atiyeh *et al.*, 2007).

### 1.3. Propriétés chimiques et sels d'argent

L'argent est le plus réactif des métaux dits nobles, inoxydable par l'oxygène atmosphérique, et il se ternit et noircit cependant au contact de l'air par suite de la présence de traces d'hydrogène sulfuré, il forme de très nombreux complexes à la fois en solution et à l'état solide (tableau 1).

- L'argent monovalent ( $\text{Ag}^+$ ): les principaux ions et sels complexes sont formés avec l'ammoniac et les amines, les halogénures, les cyanures, les thiosulfates et les composés organiques ;
- l'argent bivalent ( $\text{Ag}^{2+}$ ): les deux composés binaires de l' $\text{Ag}^{2+}$  sont seulement le fluorure et l'oxyde ;
- l'argent trivalent ( $\text{Ag}^{3+}$ ): les sels complexes sont les sulfates, nitrates et perchlorates.

Les sels d'argents solubles sont généralement plus toxiques que les sels insolubles, le nitrate d'argent ( $\text{AgNO}_3$ ) et le chlorure d'argent ( $\text{AgCl}$ ) sont les complexes d'argent les plus importants dans l'eau de boisson (Eisler, 1996; WHO, 1996; Atiyeh *et al.*, 2007).

**Tableau 1.** Propriétés physico-chimiques d'argent et de quelques sels d'argent (WHO, 2002)

Propriétés	Argent	Nitrate d'argent	Sulfure d'argent	Chlorure d'argent
<b>Autres nomenclatures</b>	Argentum; atome d'argent; argent colloïdal	Sels d'acide nitrique d'argent (I); nitrate d'argent (+1)	Acanthite; argentous sulfide	Chlorure d'argent (I); monochlorure d'argent
<b>N° CAS</b>	7440-22-4	7761-88-8	21548-73-2	7783-90-6
<b>Formule chimique</b>	Ag	AgNO <sub>3</sub>	Ag <sub>2</sub> S	AgCl
<b>Structure chimique</b>	Ag	Ag <sup>+</sup> NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Ag <sup>+</sup> S <sup>2-</sup> Ag <sup>+</sup>	Ag <sup>+</sup> Cl <sup>-</sup>
<b>Masse moléculaire</b>	107.87	169.89	247.80	143.34
<b>Etat physique</b>	Solide	Solide cristallisé	Solide gris-noir	Solide blanc
<b>Point d'ébullition</b>	2212° C	Décomposé à 440° C	Décomposé à 810° C	1550° C
<b>Solubilité dans l'eau (à 20° C)</b>	Insoluble	2160 g/l	Insoluble	1.93 mg/l
<b>Solubilité dans les acides/solvants organiques</b>	Soluble dans l'acide nitrique/ insoluble dans l'acide sulfurique	Soluble dans l'acétone et l'éthanol	/	/
<b>Densité (à 20° C)</b>	10.5 g/cm <sup>3</sup>	4.35 g/cm <sup>3</sup>	7.33 g/cm <sup>3</sup>	5.56 g/cm <sup>3</sup>

## 2. Sources

Les principales espèces minéralogiques considérées comme minerais possibles d'argent se répartissent en trois groupes :

- ✓ l'argent natif, très rarement en quantités notables que l'on trouve essentiellement en Norvège, est le plus souvent allié à d'autres métaux, notamment l'or, le mercure et surtout l'antimoine,
- ✓ les minerais sulfurés, séléniés et tellurés sont des minerais de profondeur et constituent la source la plus importante d'argent, le principal est l'argentite, Ag<sub>2</sub>S. Le plus souvent le sulfure d'argent est associé en petites quantités aux sulfures de plomb, d'antimoine, d'arsenic et de cuivre, ces minerais se trouvent principalement en Amérique du sud,

- ✓ les minerais halogènes, se rencontrent surtout dans les affleurements, le plus important est le chlorure que l'on trouve au Mexique et au Pérou (ATSDR, 1990; Eisler, 1996; Collongues, 1996).

### **3. Applications**

L'argent et ses composés font partie de plusieurs domaines d'application, leurs principaux usages concernent (tableau 2):

#### **3.1. Un puissant agent antimicrobien**

Depuis siècles les propriétés bactéricides et fongicides d'argent ont été reconnues par les anciennes civilisations, ils utilisaient des récipients en argent pour assurer la conservation de l'eau, et pour la préservation de leur nourriture de moisissures. Ainsi que dans la désinfection des eaux potables, il a été aussi utilisé dans le remède des maladies infectieuses telles que le tétanos, le rhumatisme, les ulcères d'estomac, et dans la prévention de l'ophtalmie gonococcique des nouveau-nés avant l'apparition des antibiotiques dès le 20<sup>ème</sup> siècle (Choi *et al.*, 2008; Fontenoy et Sellal, 2010; Greulich *et al.*, 2012). De nos jours, des nouvelles technologies ont permis de mieux incorporer ce métal dans des matériaux biomédicaux, citons parmi eux : les prothèses; les cathéters; les sondes urinaires; les lentilles ophtalmiques; les implants de renfort de paroi; les textiles et les pansements à l'argent.

Ces dispositifs permettent de mettre en évidence l'effet thérapeutique et prophylactique d'argent dans la prévention de la colonisation des microorganismes inclus les bactéries résistantes aux antibiotiques développant des infections telles que celles de la cornée et de la peau, ainsi que dans la cicatrisation des blessures, et traitement des brûlures (Wright *et al.*, 1998; Drake et Hazelwood, 2005; Atiyeh *et al.*, 2007).

Mécanismes d'action d'argent contre la cellule bactérienne :

- ✓ l'ion d'argent peut se lier à la molécule d'acide désoxyribonucléique (ADN) bactérien donnant une forme condensée influant le système répliatif de la cellule ;
- ✓ il peut aussi entrer en interaction avec les groupements thiol des protéines induisant l'inactivation des protéines bactériennes telle que les enzymes de la chaîne respiratoire ;
- ✓ il peut former des complexes avec le sulfure, l'azote et l'oxygène des groupements fonctionnels des composés organiques présents dans la bactérie, altérant sa paroi.

Toutes ces actions pouvant causer la lyse et la mort de la cellule microbienne ou inhiber sa croissance (Kumar et Münstedt 2005; Lin *et al.*, 2011; Greulich *et al.*, 2012).

**3.2. Application dans l'industrie**

Dans l'industrie alimentaire, l'argent est utilisé dans la fabrication de jus de fruits et de certaines boissons. L'industrie photographique, la fabrication des bijoux et l'argenterie occupent 40%, 31% et 22% respectivement de la consommation de ce métal (Garnier, 2000; WHO, 2002; Drake et Hazelwood, 2005).

**Tableau 2.** Différentes utilisations d'argent métallique et des composés d'argent (Drake et Hazelwood, 2005)

Composés d'argent	Argent métallique et alliages d'argent
Photographie, batteries, lubrification	Bijouteries, argenterie, soudures
Bactéricides, catalyseurs, médicinales	Composants électroniques, puits de chaleur
Ensemencement des nuages, miroirs	Superconducteurs, bactéricide, monnaies
Galvanoplastie, conservateurs des fleurs	Amalgames dentaires, médailles
Purification d'eau, produits cosmétiques	

**4. Les nanoparticules d'argent**

Les nanoparticules ont été définies par l'union européenne comme des particules avec une, ou plusieurs dimensions dont l'ordre est  $\leq 100$  nm, l'augmentation de leur application dans divers produits commerciaux due au développement de la nanotechnologie. Parmi les différents nanomatériaux, les nanoparticules d'argent (AgNPs) sont largement utilisées dans plusieurs domaines (104 sur 502 des nanoparticules utilisées), ils sont des assemblages d'atomes d'argent (un nombre d'atomes de l'ordre du millier), elles font l'objet d'un intérêt croissant, les scientifiques ont été fascinés par leur effet biocide, catalytique ainsi que leurs propriétés optiques (EC, 2000; Miura et Shinohara, 2009; Lacour, 2010; Nair *et al.*, 2013;).

Grâce aux activités fongicides et bactéricides, les AgNPs sont très employées dans le traitement antimicrobien des instruments médicaux citons les cathéters urinaires et veineux et les bandages des blessures, ils sont très efficaces comme des antiinflammatoires et procicatrisants, et comme des sondes électrochimiques et chimiques pour détecter de variables biomolécules et contrôler les biotransformations, ainsi que leur intervention dans l'absorption d'énergie solaire et dans l'imagerie médicale, outre, ce sont des nanomatériaux très utilisés dans les produits de consommation inclus le téléphone mobile, les brosses à dents, les produit cosmétiques, les habillements, les réfrigérateurs, les machines à laver, les détergents et les textiles (Fontenoy et Sellal, 2010; Lacour, 2010; Nair *et al.*, 2013; Sharma *et al.*, 2014).

La méthode de production d'AgNPs est basée sur la réduction chimique de sels d'argent (le plus souvent est l'AgNO<sub>3</sub>) par le borohydrure de sodium, le citrate, le glucose, l'hydrazine et l'ascorbate. En pratique, les suspensions AgNPs ne sont pas pures, elles sont constituées d'un mélange d'ions d'argent, des nanoparticules, et des agrégats des nanoparticules (Fewtrell, 2014; Hadrup et Lam, 2014). Les AgNPs se caractérisent par une dissolution lente permettant la libération continuée des ions Ag<sup>+</sup> dans le milieu, en raison de leur consommation, de nombreuses études ont intéressé à l'évaluation de la répercussion de leur absorption par le corps humain sur les fonctions biologiques, ainsi que leurs effets sur l'environnement, avec une comparaison entre leur toxicité et la toxicité des sels d'Ag (Miura et Shinohara, 2009; Bilberg *et al.*, 2010; Teodoro *et al.*, 2011).

## **5. Toxicité**

### **5.1. Toxicocinétique**

#### **5.1.1. Absorption**

##### **a. Voie orale**

La voie orale est considérée comme la principale voie d'administration des composés d'argent et d'argent colloïdal dans le corps humain suivant plusieurs routes d'exposition : aliments contaminés; exposition professionnelle; eau de boisson; intervention comme des agents thérapeutiques contre les infections gastro-intestinales et comme des additifs alimentaires et des alternatives médicinales ainsi que dans la thérapie anti-tabagisme; les amalgames dentaires à base d'argent et la consommation accidentelle à l'AgNO<sub>3</sub> ou aux autres composés colorés d'argent (WHO, 1996; Drake et Hazelwood, 2005; Lansdown, 2010<sup>b</sup>; Hadrup et Lam, 2014). L'absorption par les muqueuses de la cavité buccale et les muqueuses gastro-intestinales est déterminée par le degré d'ionisation des composés d'argent et leur interaction avec les protéines réceptrices des membranes cellulaires, ainsi que l'âge, la santé, l'état nutritionnel et la composition d'aliments (Lansdown, 2010<sup>b</sup>).

Furchner *et al.* (1968) ont trouvé qu'après une administration orale d'<sup>110</sup>Ag, l'absorption intestinale a été estimée de 0.4%, 2%, 6% et 10% chez la souris, le rat, le singe et le chien respectivement. Tandis qu'une patiente de 47 ans qui a souffert de l'argyrie, présentant une rétention de 18% (East *et al.*, 1980).

##### **b. Voie respiratoire**

L'administration d'argent par voie respiratoire est plus fréquente en milieu professionnel par inhalation des poussières ou des fumées contenant l'Ag, l'oxyde d'argent (Ag<sub>2</sub>O), ou l'AgNO<sub>3</sub>, le grand risque est sur ceux qui sont exposés aux aérosols des particules d'Ag utilisées dans l'imprégnation des biomatériaux et dans le placage, en plus, l'inhalation

d'argent à partir des produits médicaux constitue aussi une route d'exposition (Drake et Hazelwood, 2005; Lansdown, 2010<sup>a</sup>).

L'ionisation d'argent inhalé ou des composés d'argent dans les sécrétions muqueuses ou au niveau des alvéoles pulmonaires en ions  $\text{Ag}^+$  conduit à leur absorption par l'épithélium alvéolaire, ce métal se précipite au niveau pulmonaire avant d'être absorbé par les macrophages alvéolaires (Lansdown, 2010<sup>a</sup>). Un homme de 27 a inhalé accidentellement l'<sup>110</sup>Ag dans un incident mineur au réacteur nucléaire, ce cas fait l'étude de Newton et Holmes (1966) qui ont intéressé à la longue période de rétention de ce métal, ils ont indiqué que la localisation dans le tissu hépatique a été 2 semaines après inhalation, concluant que les composés d'Ag absorbés sont accumulés dans les alvéoles. Outre, Pifer *et al.* (1989) ont suggéré une absorption très diminuée d'Ag chez des travailleurs exposés à 0,005 à 0,240 mg/m<sup>3</sup> avec une concentration plasmatique égale à 0,01 µg/l.

Chez les animaux, Phalen et Morrow (1973) ont mentionné que la précipitation des particules sphériques d'Ag de 0,5 µm de diamètre dans les poumons des chiens a été 17%.

### c. Voie cutanée

Le contact avec la peau s'effectue principalement dans les milieux de travail; lors de manipulation des solutions contenant de l'argent dans les matériaux de la radiographie et de la photographie, ainsi que dans les amalgames dentaires (Eisler, 1996). Cette voie permet aussi la pénétration du métal par l'application des crèmes de brûlure ou pour traiter les blessures, et par le contact avec les bijoux d'argent (Drake et Hazelwood, 2005).

Des études cliniques et expérimentales ont indiqué que l'absorption sous cutanée d'argent est relativement diminuée. La kératine et les phospholipides de l'épiderme constituent une barrière efficace contre les groupements sulfuriques liant les ions  $\text{Ag}^+$  (Lansdown, 2010<sup>b</sup>). Norgaard (1954) a montré qu'une concentration inférieure à 4% de l'ensemble d' $\text{Ag}^+$  libéré à partir d'une solution d' $\text{AgNO}_3$  est absorbée par la peau.

L'absorption sous cutanée à partir des crèmes d'argent appliquées sur la peau dépend de la sévérité, la profondeur, la vascularisation du blessure ou de brûlure ainsi que la concentration en ions  $\text{Ag}^+$  (Coombs *et al.*, 1992).

## 5.1.2. Distribution

### a. Voie orale

Les ions  $\text{Ag}^+$  après administration orale paraissent se déposer dans plusieurs organes. En effets, l'argyrie se manifeste par la présence de granules d'argent en quantités importantes au niveau de la peau (Ohbo *et al.*, 1996). En plus, le métal a été détecté dans le foie, les reins, le cerveau, la rate, les yeux, les muscles, le sang, l'intestin grêle, l'estomac, les poumons, la

vessie, la prostate, la langue, les dents, les glandes salivaires, la thyroïde, la parathyroïde, le cœur, le pancréas, et le duodénum, (Pelkonen *et al.*, 2003; Loeschner *et al.*, 2011; Hadrup et Lam, 2014).

### **b. Voie respiratoire**

L'étude de Newton et Holmes (1966) a révélé que plus de 50% d'argent retenu par le corps a été trouvé dans le foie après 16 jours d'exposition. De même, Phalen et Morrow (1973) ont noté l'accumulation du métal chez les chiens principalement dans le foie, avec de faibles quantités dans les poumons, le cerveau et les muscles.

### **c. Voie cutanée**

L'utilisation d'AgNO<sub>3</sub> dans le traitement des brûlures de 2 hommes a induit la distribution du métal dans les tissus suivants: muscles (0.03-2.3 ppm), foie (0.44 ppm), rate (0.23 ppm), rein (0.14 ppm), cœur (0.032-0.04 ppm) et os (0.025 ppm) (ATSDR, 1990).

L'étude de Wan *et al.* (1991) a révélé les concentrations suivantes d'argent chez un patient qui a souffert de brûlures mourant par une atteinte rénale après 8 jours de traitement par crème de sulfadiazine d'argent: 970 µg/g, 14 µg/g et 0.2 µg/g tissu dans la cornée, le foie et le rein respectivement.

### **5.1.3. Métabolisme**

La localisation d'argent dans les tissus résulte d'une précipitation des sels d'argent insolubles. Ces derniers peuvent être transformés en composés solubles comme les albuminates de sulfure d'argent se liant ou se complexant avec les groupements amines et carboxyles de l'acide ribonucléique (ARN), l'ADN et les protéines où ils peuvent être réduits en argent métallique par l'acide ascorbique ou les catécholamines. En cas d'argyrie, la coloration bleu grisâtre de la peau est causée par la photoréduction d'AgCl en Ag<sup>0</sup> durant l'exposition à la lumière ultraviolette. Ce dernier est ensuite oxydé et lié formant des granules noirs d'Ag<sub>2</sub>S qui se localisent dans les membranes basales citant l'épiderme, les glomérules et les intestins ainsi que dans les macrophages avec un diamètre de 12 nm.

Ce métal induit à la synthèse de métallothionéines par combinaison aux protéines riches en cystine formant des complexes stables jouant un rôle dans la protection des tissus contre les effets toxiques des xénobiotiques. Au niveau de l'épiderme, ces complexes peuvent favoriser la guérison des blessures. Le foie et le rein sont les principales voies d'excrétion d'argent; l'accumulation des granules d'Ag<sub>2</sub>S dans les vésicules lysosomales de ces organes permet leur élimination par le canal biliaire et urinaire.

Lors d'exposition au sélénium (Se), le soufre pourra être remplacé par ce dernier; dans ces conditions, l'accumulation d'Ag au niveau rénal sera plus importante, ce qui peut

provoquer le développement d'argyrie chez des personnes exposées à l'Ag et prennent une alimentation avec de larges quantités de Se (ATSDR, 1990; Eisler, 1996; Lansdown, 2006; Loeschner *et al.*, 2011; Hadrup and Lam, 2014).

#### 5.1.4. Excrétion

##### a. Voie orale

###### ✓ Excrétion fécale

L'élimination d'argent par voie biliaire se traduit par ses concentrations élevées dans les fèces (Holler *et al.*, 2015). Furschner *et al.* (1968) ont mentionné que l'évacuation d'argent à partir des fèces est selon les valeurs suivantes: 99.6%, 98%, 90% et 98% chez la souris, le rat, le chien et le singe respectivement alors que Loeschner *et al.* (2011) a montré que 49% des ions d'Ag sont excrétés à partir des fèces chez le rat.

###### ✓ Excrétion urinaire

D'après plusieurs études, les concentrations d'argent dans les urines sont très négligeables par rapport à celles dans les fèces; d'après East *et al.* (1980), elles ont été estimées de 2 à  $4 \times 10^{-4}\%$ , alors que Furscher *et al.* (1968) ont trouvé: 0.001%, 0.001%, 0.019-0.26% et 0.025-0.061% chez la souris, le rat, le singe et le chien respectivement. Enfin Loeschner *et al.* (2011) ont mentionné que 0.057% d'argent administré a été trouvé dans les urines.

##### b. Voie respiratoire

L'élimination fécale a été trouvée comme la première voie d'excrétion après inhalation chez les chiens et l'homme (Newton et Holmes, 1966; Phalen et Morrow, 1973), Di Vincenzo *et al.* (1985) ont évalué les concentrations sériques (11 µg/l), urinaires (< 0.005 µg/g) et fécales (15 µg/g) d'argent chez 37 travailleurs exposés à l'argent dans des industries comparé aux sujets non exposés.

##### c. Voie cutanée

La croissance des cheveux et des ongles constitue l'un des voies d'excrétion d'Ag par le corps humain, mais l'élimination s'effectue principalement par le foie via la bile et par les reins, des hautes températures et une humidité élevée conduisent au hyper hydratation provoquent la mobilisation d'argent à partir de la peau et les membranes muqueuses (Lansdown, 2006).

#### 5.1.5. Demi-vie biologique

##### a. Voie orale

La demi-vie biologique d'argent dans l'étude de Furscher *et al.* (1968) a été approximativement 1 jour chez les espèces mentionnées précédemment, cette durée pourra

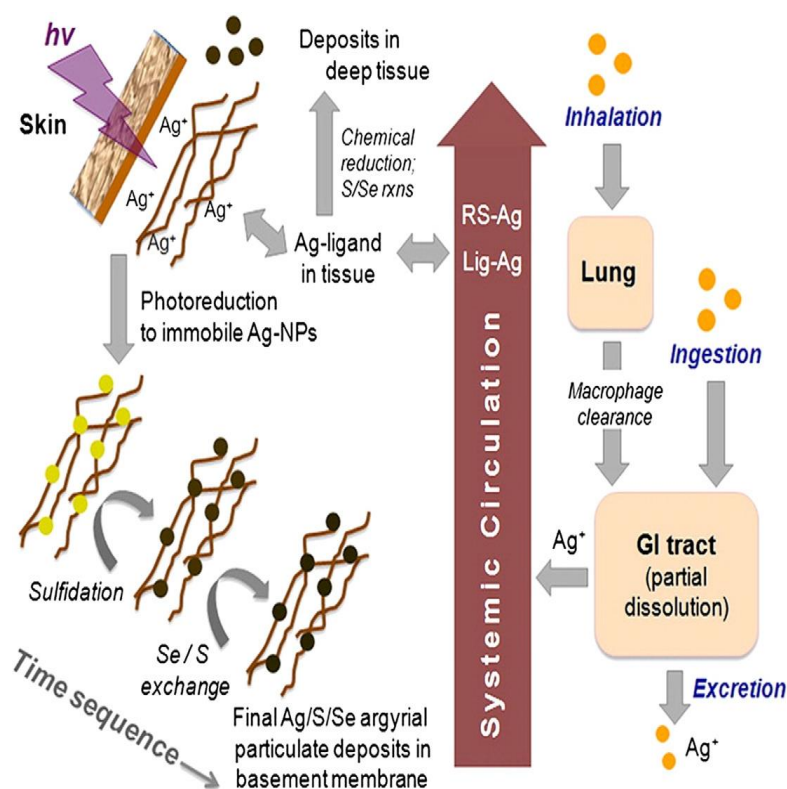
être due à l'élimination fécale d'argent non absorbé. Chez la femme argyrique dans l'étude d'East *et al.* (1980), la quantité d'argent absorbée a resté constante pour plus de 30 semaines. Alors que Matuk *et al.* (1981) ont trouvé que l'administration orale d'AgNO<sub>3</sub> a causé une accumulation d'Ag dans les yeux durant 12 mois.

Tandis que Vander Zande *et al.* (2012) ont noté la persistance d'Ag dans le cerveau et les testicules des rats après 08 semaines d'exposition orale.

**b. Voie respiratoire**

Une demi vie biologique d'Ag dans les poumons a été estimée de 1 jour, tandis que dans le foie a été 52 jours (Newton et Holmes, 1966). Chez le chien, la clearance de 59% de la dose d'argent radioactif administrée par les poumons a été dans 1.7 jours (Phalen et Morrow, 1973).

La figure ci-dessous montre les différentes transformations biologiques d'argent d'après les différentes voies d'administration.



**Figure 1.** Résumé des transformations biologiques des ions d'argent dès l'absorption jusqu'à l'excrétion et formation des dépôts d'argyrie (Sharma *et al.*, 2014)

**5.2. Toxicité par voie d'administration**

**5.2.1. Voie orale**

**a. Dose létale**

La toxicité aigüe d'argent sur le corps humain est le résultat des surdosages accidentels ou en cas de suicide par des composés médicinaux renfermant ce métal, aucune étude a signalé des décès après exposition orale des êtres humains à l'argent ou ses composés. Le tableau 3 résume les doses létales et les doses létales médianes (DL50) trouvées par différentes études.

**Tableau 3.** Dose létale et dose létale médiane

Organisme	Dose/ durée d'exposition	Effets	Références
<b>Humains</b>	2-30 g d'AgNO <sub>3</sub> /une seule dose	Doses > 10 g, la mort survient en quelques heures à quelques jours	Smith and Carson, 1977; EPA, 1980
<b>Rats</b>	1500 mg/l/2-4 semaines	Dose mortelle	Smith and Carson, 1977
	1586 mg/l/37 semaines	Un certain nombre de décès dès la 23 <sup>ème</sup> semaine	U.S.PHS, 1990
	2589 mg/l/2 semaines	La mort de 25% des rats	U.S.PHS, 1990
	24 mM d'AgNO <sub>3</sub> dans l'eau de boisson	3 sur 12 rats sont morts après 5 jours	Walker, 1971
	123 mg de cyanure d'Ag/Kg de poids corporel	Toxicité aigüe DL50	Lockhart, 1983
	200-400 mg d'arséniate d'Ag/Kg de poids corporel	Toxicité aigüe DL50	Lockhart, 1983
	280 mg d'AgNO <sub>3</sub> /Kg de poids corporel	Toxicité aigüe DL50	Tamimi <i>et al.</i> 1998

**b. Effets systémiques**

- ✓ Effets sur le poids corporel

Aucune perte du poids corporel, n'a été mentionnée après administration orale d'Ag ou ses composés dans le corps humain. De même, plusieurs études ont montré que le métal n'a pas affecté le poids corporel des rats (Rungby et Danscher, 1984; Cha *et al.* 2008; Vander Zande *et al.*, 2012; Hudrup et Lam, 2014).

Contrairement, autres investigations ont révélé une diminution du poids des animaux expérimentaux après ingestion d'Ag, AgNO<sub>3</sub> et d'acétate d'argent (Ag-Ac) durant plusieurs semaines (Matuk *et al.*, 1981; ATSDR, 1990; Hadrup *et al.*, 2012<sup>a</sup>).

- ✓ Effet sur le tube digestif

L'utilisation thérapeutique ou la consommation accidentelle des doses élevées d'AgNO<sub>3</sub>; considéré comme un agent corrosif peuvent endommager la cavité buccale ou le tractus gastrointestinal, et entraîner une rigidité et des maux abdominaux, une irritation de l'estomac, une diarrhée, un vomissement et une anorexie, ces effets pourront être attribués au forte acidité de l'anion nitrate (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) libéré par le sel d'argent, outre, ces effets ont aussi été signalés après ingestion de 50 à 260 g d'argent métallique (EPA, 1980; Eisler, 1996; Lansdown, 2010; Hadrup et Lam, 2014).

✓ Effets sur le foie, les reins et le système cardiovasculaire

Des personnes qui ont été exposées chroniquement à l'argent pendant une longue période; ont souffert des atteintes hépatiques et rénales (Eisler, 1996; Drake et Hazelwood, 2005). Sharma *et al.* (1997) ont noté après une ingestion de 50 mg d'Ag métallique pendant 20 jours par 30 volontaires, une inhibition des enzymes marqueurs de la fonction hépatique et une réduction des taux de lipides et du glucose sériques. En revanche, aucune étude n'a signalé l'effet d'Ag sur le système cardiovasculaire chez l'homme (ATSDR, 1990; Eisler, 1996).

Outre, les expériences animales ont observé les manifestations toxiques suivantes: précipitation du métal au niveau du tissu hépatique et rénal, ainsi que des changements dégénératifs; hémorragies rénales; nécrose hépatique; augmentation de la phosphatase alcaline et du cholestérol, hypertrophie ventriculaire gauche (Olcott, 1950; Eisler, 1996; Drake et Hazelwood, 2005; Hadrup *et al.*, 2012<sup>a</sup>).

✓ Effets dermatologiques et oculaires

Une coloration grise ou bleu grise de la peau a été définie par l'argyrie observée chez des individus pris de petites ou grandes quantités d'Ag métallique ou composés d'Ag (1-30 g) durant des mois à des années (ATSDR, 1990; Sapra et Sapra, 2014; Holler *et al.*, 2015).

D'après cette voie, on distingue: l'argyrie généralisée résulte d'une augmentation du taux d'argent dans le sang (argyraemie), les urines, les fèces et les cheveux, ainsi qu'une déposition de minuscules granules d'Ag au niveau de la peau (derme), des muqueuses, des glandes sébacées et sudoripares et aussi dans la membrane basale glomérulaire.

En plus, ces particules peuvent être détectées en fortes concentration dans le foie, la rate et les surrénales (Reichl, 2004; Brandt *et al.*, 2005; Lansdown, 2010<sup>b</sup>; Holler *et al.*, 2015).

Elle est prédominante au niveau des gencives, des mains, du nez, du visage et des parties découvertes, aggravée par l'exposition au soleil, l'argent conduit aussi à la production accrue de la mélanine; augmentant l'intensité de la coloration.

Cette maladie de la peau n'a pas d'autres inconvénients que d'être inesthétique comme le montre la figure 2, elle est définitive et dans les formes évoluées, on constate une coloration bleue des ongles (Garnier, 2000; Reichl, 2004; Brandt *et al.*, 2005; Lansdown, 2010<sup>b</sup>), on peut aussi parler d'une argyrie localisée ou tatouages gingivaux chez des patients utilisant des amalgames dentaires à base d'argent (Garnier, 2000; Schrauben *et al.*, 2012).

Une coloration de la conjonctive et de la cornée, due à des dépôts oculaires d'Ag appelée argyrose a été aussi observée après ingestion chronique d'Ag, elle peut altérer la vision nocturne (Rungby, 1986; Garnier, 2000; Mayr *et al.*, 2009; Lansdown, 2010<sup>b</sup>).

De nos jours, l'argyrie est moins fréquente grâce à la diminution de la consommation orale des produits médicaux contre les infections gastro-intestinales renfermant de l'argent, mais le risque reste toujours surtout en milieu professionnel, et à cause de la vente libre et noncontrôlée des additifs alimentaires, rafraîchisseurs d'haleine, des antiseptiques et des suppléments utilisés dans le traitement du SIDA (syndrome d'immunodéficience acquise) et du cancer contenant l'argent (Garnier, 2000; Lansdown, 2010<sup>a</sup>; Sapra and Sapra, 2014).



**Figure 2.** Photo d'une patiente à l'âge de 36 ans avec une coloration grise caractérisant le visage et le cou. La photo a été prise en 1978 (Jacobs, 2006).

De même, plusieurs études ont révélé cette toxicité dermatologique et oculaire chez les animaux expérimentaux (Walker, 1971; Rungby, 1986; ATSDR, 1990).

Les principales études et cas cliniques sont mentionnés dans le tableau 4.

**Tableau 4.** Quelques patients et rats expérimentaux souffrirent de l'argyrie et/ou l'argyrose après ingestion d'Ag ou ses composés

<b>Organisme</b>	<b>Dose/ durée d'exposition</b>	<b>Effets</b>	<b>Références</b>
<b>Humains</b>	Pilules anti-tabac: 200 pilules contenant Ag/jour/40 ans	Argyrie généralisée	Ohbo <i>et al.</i> , 1996
	236.60 ml d'Ag colloïdal préparé par le patient contre une infection rénale/jour/4 jours	Argyrie généralisée	Brandt <i>et al.</i> , 2005
	Gouttes nasales contenant Ag /3 ans	Argyrie généralisée	Jacobs, 2006
	2 gallons des protéines d'Ag colloïdal/jours/10 ans	Argyrie + argyrose	Schrauben <i>et al.</i> , 2012
<b>Rats</b>	0.02% d'Ag-Ac/3 mois	Argyrose	Rungby, 1986
	12 mM d'AgNO <sub>3</sub> dans l'eau de boisson/10 semaines	Argyrie	Walker, 1971

**c. Effets neurologiques**

Plusieurs cas d'encéphalopathie et quelques observations de neuropathie périphérique sont également rapportés, dans le cadre d'une argyrie sévère (Garnier, 2000).

Outre, Ohbo *et al.* (1996) ont conclu que le dépôt des granules d'argent dans le système nerveux central (SNC) est l'origine de crises convulsives chez un patient argyrique, de plus, Landas *et al.* (1985) ont observé l'accumulation d'AgNO<sub>3</sub> au niveau des organes circumventriculaires et du noyau paraventriculaire et supraoptique de l'hypothalamus d'une patiente argyrique utilisée chroniquement des gouttes nasales contenant l'Ag. De même, Mirsattari *et al.* (2004) ont mentionné un état de mal épileptique myoclonique après ingestion orale des quantités excessives d'Ag colloïdal.

Rungby et Danscher (1984) ont suggéré que l'hypoactivité des souris argyriques est due à l'influence d'accumulation d'Ag dans le SNC sur la fonction neurologique, autres études ont montré l'augmentation d'ARN et d'ADN cérébraux (Eisler, 1996; Lansdown, 2007) ainsi qu'une augmentation des neurotransmetteurs (dopamine et noradrénaline) après exposition au métal (Hadrup *et al.*, 2012<sup>b</sup>).

En revanche, plusieurs cas cliniques et expériences animales n'ont pas mis en évidence la capacité du métal à traverser la barrière hématoencéphalique, des recherches sont nécessaires pour établir une neurotoxicité d'Ag proprement dite (EC, 2000; Lansdown, 2007).

**d. Effets immunologiques**

D'une part, aucune immunotoxicité n'a été détectée après ingestion orale d'Ag par les humains (Drake et Hazelwood, 2005).

D'autre part, le métal apparaît immunotoxique dans le corps animal: développement des autoanticorps antinucléaires et antifibrillaires avec signes d'une lymphocytotoxicité de type T et B; infiltration lymphocytaire et diminution du poids du thymus (Hollinger, 1996; Cha *et al.*, 2008; Havarinasab *et al.*, 2009; Hadrup *et al.*, 2012<sup>a</sup>). En revanche, autres études comme l'étude de Vander Zande *et al.* (2012) n'a observé aucune immunotoxicité chez le rat.

**e. Effets reproductifs**

L'exposition humaine à l'Ag n'a révélé aucun signe toxique sur l'appareil reproductif (ATSDR, 1990; Hadrup et Lam, 2014).

Quelques études sont intéressées aux effets reproductifs du métal. Des changements de la morphologie du noyau et de cytoplasme cellulaires des ovaires des souris ont été rapportés par Hadek (1966). De plus, une embryotoxicité a été détectée entraînant la mort des nouveau-nés dans les 24 heures après naissance (Shavlovski *et al.*, (1995).

**f. Effets mutagènes et cancérigènes**

Aucune étude n'a montré que l'argent est un agent génotoxique ou cancérigène chez l'homme et l'animal (EPA, 1980; ATSDR, 1990; Eisler, 1996; Drake et Hazelwood, 2005).

**5.2.2. Voie respiratoire****a. Dose létale**

Aucune mortalité n'a été signalée chez l'homme ou l'animal après exposition d'argent par inhalation (ATSDR, 1990; Lansdown, 2010<sup>a</sup>).

**b. Effets systémiques**

## ✓ Effets respiratoires

Rosenman *et al.* (1987) ont employé 27 travailleurs engagés dans la fabrication des poudres métalliques inclus Ag et présentant des taux élevés du métal dans les urines et le sang; 56% parmi eux sont soufferts des symptômes respiratoires suivants: démangeaisons, yeux rouges et en larmes, éternuements, congestion ou écoulement nasal, mal de gorge, toux, respiration sifflante et étroitesse de la poitrine. Alors que 30% des travailleurs se sont plaints de saignements du nez.

De plus, l'inhalation répétée peut être responsable d'une coloration des muqueuses respiratoires (nasale, pharyngo-laryngée, bronchique); sans retentissement fonctionnel, bronchite, métaplasie squameuse, emphysème et réduction du volume pulmonaire (Garnier, 2000; Drake et Hazelwood, 2005; Lansdown, 2010<sup>a</sup>).

L'inhalation répétée de dérivés irritants (nitrate, oxyde, etc.) peut être responsable d'une broncho-pneumopathie obstructive (Garnier, 2000).

✓ Effets sur le tube digestif

Des maux abdominaux sous forme de brûlures d'estomac ont été rapportés chez 10 parmi 30 travailleurs exposés aux aérosols d'AgNO<sub>3</sub> et/ou d'Ag<sub>2</sub>O durant plus de 10 ans, les concentrations du métal dans le milieu de travail comprises entre 0.039 et 0.348 mg Ag/m<sup>3</sup> (Rosenman *et al.*, 1979).

✓ Effets hématologiques

L'étude de Rosenman *et al.* (1979) n'a révélé aucun signe d'hématotoxicité sauf une élévation d'hémoglobine chez un seul individu, Pifer *et al.* (1989) ont noté une diminution du nombre des globules rouge ainsi qu'une augmentation du volume moyen corpusculaire (VMC) chez des travailleurs exposés chroniquement aux composés d'argent insoluble, ces études ne suffisent pas pour parler d'une véritable hématotoxicité d'argent absorbé par inhalation (ATSDR, 1990).

✓ Effets sur le foie et les reins

L'inhalation d'Ag ou ses composés n'apparaît pas hépatotoxique chez l'homme ou l'animal. Pifer *et al.* (1989) n'ont trouvé aucune différence significative entre les enzymes hépatiques des travailleurs de l'expérience et celles des témoins.

Concernant l'effet néphrotoxique d'Ag, Rosenman *et al.* (1987) ont signalé une augmentation d'excrétion d'une enzyme rénale: N- acétyl- B- D- glucosaminidase (NAG) ainsi qu'une diminution du clearance de la créatinine chez les travailleurs comparés aux témoins, ce qui reflète un dysfonctionnement rénal, mais le groupe a mis en évidence l'exposition des travailleurs au cadmium (Cd) qui a connu par sa néphrotoxicité concluant que l'argent n'a pas été la cause définitive de ce désordre fonctionnel.

✓ Effets oculaires et dermatologique

Des atteintes oculaires et dermatologiques ont été mentionnées par plusieurs investigations après inhalation d'argent dans le milieu professionnel.

D'après l'étude de Moss *et al.* (1979), 20 travailleurs parmi 30 sont soufferts d'une argyrose, alors que Rosenman *et al.* (1979) ont noté une faible vision nocturne chez 10 personnes présentant des dépôts d'argent dans les yeux, une argyrose chez 20 personnes sur 30 avec une fatigue, des maux de tête et une nervosité, une argyrie chez 6 cas sur 30 a été aussi détectée, de plus, Rosenman *et al.* (1987) ont rapporté une difficulté de vision nocturne chez 22% des travailleurs et une argyrose chez 63%.

Plus récemment, Schlotzer *et al.* (2001) ont observé une argyrose et des changements épithéliaux multifocaux dégénératifs dans la cornée.

### c. Autres effets

D'après plusieurs études, ce métal n'a pas induit des effets reproductifs, mutagéniques et cancérigènes (ATSDR, 1990; Lansdown, 2010<sup>a</sup>).

Arai *et al.* (2015) ont étudié l'effet immunotoxique d'AgNO<sub>3</sub> après son injection dans les poumons des souris induisant l'infiltration des neutrophiles au niveau pulmonaire.

### 5.2.3. Voie cutanée

#### a. Dose létale

L'application cutanée d'AgNO<sub>3</sub> a causé un cas de mort de cochon d'inde après exposition à 2.3 ml de 0.239 M d'une solution d'AgNO<sub>3</sub> pendant 08 semaines (ATSDR, 1990).

#### b. Effets systémiques

##### ✓ Effets dermatologiques

Une argyrie localisée ou une coloration locale de la peau peut être se produire après contact avec la peau et les muqueuses durant de longues périodes, cette dernière a été rapportée chez les travailleurs utilisant l'argent métallique dans le forage, le polissage, la gravure, la soudure, la fonte, ...etc (Eisler, 1996; Sterling, 2014). Les boucles d'oreilles à base d'Ag ou lors des acupunctures par des aiguilles d'argent constituent aussi un risque de développer cette affection dermatologique (Sterling, 2014).

La sulfadiazine d'argent est une poudre blanche, microcristalline avec une faible solubilité dans l'eau, il apparait sans effets indésirable lors de son usage dans des crèmes afin de traiter les brûlures ou les blessures d'intensité modérée. En revanche, lors d'un traitement chronique ou de sévères brûlures, ce composé d'argent peut provoquer une telle argyrie.

De plus, des cas rares ont été rapportés sur l'induction d'une argyrie systémique après application des crèmes à base de sulfadiazine d'argent (Lansdown, 2002; Lansdaown, 2007; Sterling, 2014).

##### ✓ Autres effets systémiques

L'argent a été aussi trouvé comme un agent néphrotoxique, une étude a été confirmée par des concentrations élevées du métal dans le sang et les urines.

Une leucopénie a été observée après application prolongée de sulfadiazine d'argent qui peut être secondaire à une toxicité médullaire (Wan *et al.*, 1991; Lansdown, 2002, Atiyeh *et al.*, 2007).

L'intoxication d'AgNO<sub>3</sub> après son utilisation sous certaines conditions cliniques comme une antiseptique contre les brûlures, peut être la cause des dommages neurologiques (Lansdown, 2007).

Une perte de poids de cochon d'inde comprise entre 10-20% a été notée après application de 81 mg d'AgNO<sub>3</sub> (2 ml d'une solution de 0.239 M) pendant 08 semaines (ATSDR, 1990).

### c. Allergie

Une irritation cutanée est directement proportionnelle à la concentration, la durée d'exposition et la sensibilité de la peau aux sites d'exposition à l'AgNO<sub>3</sub> (Lansdown, 2006; Lansdown, 2007). Cette sensibilité se manifeste sous forme d'éruptions rouges au niveau des zones exposées, elle est plus fréquente chez les mineurs d'argent, les bijoutiers, les photographes, ...etc. La sulfadiazine d'argent est moins corrosif que le nitrate d'argent, des études ont montré que l'hypersensibilité induit par ce dernier est à l'origine de sulfadiazine et pas nécessairement à la molécule d'Ag (Lansdown, 2002; Sterling, 2014).

## 6. Effets sur l'environnement et exposition humaine

Le cycle biogéochimique d'argent est perturbé grâce aux larges utilisations dans l'industrie, la photographie, la bijouterie,...etc. Ce qui induit à une libération accrue des ions Ag<sup>+</sup> dans l'environnement; ces ions sont considérés toxiques aux organismes marins et terrestres (Bauner et Wood, 2002; Hiriart-Baer *et al.*, 2006).

De récentes études ont intéressé à cette toxicité par évaluation du développement et de la reproduction ainsi que d'autre paramètres concernant certains organismes marins citant les algues, les poissons et les crustacées (Hiriart-Baer *et al.*, 2006; Nair *et al.*, 2013; Funck *et al.*, 2013; Massarsky *et al.*, 2014; Ribeiro *et al.*, 2014).

Dans les plantes terrestres, les concentrations d'argent sont inférieures à 0.1mg/kg poids secs, mais, ces concentrations sont relativement élevées dans les arbres, les arbustes et les plantes des régions proches aux mines d'argent; les graines et les fruits contiennent des quantités élevées que les autres parties de la plante (Eisler, 1996).

La consommation de ces organismes par l'homme à partir de l'alimentation constitue une voie d'administration d'argent (Holler *et al.*, 2015). NAA (Neutron Activation Analysis) a trouvé une consommation journalière de 1-16 µg. Alors que l'US. Agence de protection environnementale (U.S. EPA) a estimé une valeur de 10 à 44 µg d'argent dans l'alimentation par jour (EPA, 1980).

En plus, l'eau de mer renferme une concentration comprise entre 0.055 et 1.5 µg/l, l'eau de boisson non traité par l'argent comme désinfectant contient aussi une concentration

diminuée du métal (5 µg/l) (Holler *et al.*, 2015). EPA (1980) a recommandé une concentration maximale d'argent dans l'eau de boisson de 0.1 mg/l.

La concentration d'Ag dans le sol varie selon la zone géologique, les granites de Nevada (états unis) renferment 50 mg/kg d'Ag, alors que la concentration dans l'aire en Californie a été rapportée de 2 ng/m<sup>3</sup>, la concentration dans les eaux de la pluie, a été variée de 0.04 pg/ml à 5 ng/ml grâce à la pollution de l'air. De plus, une exposition limitée à 0.01 mg d'argent dans l'air a été recommandée (Holler *et al.*, 2015).

***CHAPITRE II :***  
***LE STRESS OXYDATIF***

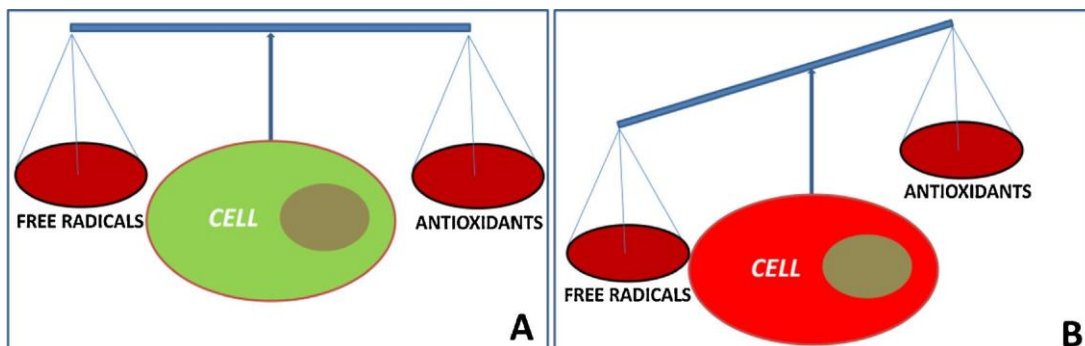
**1. Le paradoxe d’oxygène**

L’oxygène, apparu voici trois milliards d’années dans la terre, est un gaz indispensable à la vie. Notre atmosphère renferme environ 21% de ce gaz et à l’exception de certains organismes anaérobies et aérotolérants, il est nécessaire aux organismes dits aérobies tels que les animaux, les plantes et les bactéries pour produire de l’énergie par l’intermédiaire de chaîne de transport d’électrons. L’oxygène, en tant que récepteur final de ces derniers dans l’organisme, se transforme en molécules d’eau au niveau de cette chaîne respiratoire mitochondriale. Pour ces raisons, cette molécule peut se fixer sur le fer de l’hémoglobine, pour être transportée et distribuée vers les tissus et diffusée aisément à travers les membranes biologiques. En outre, le processus de réduction de l’oxygène en eau n’est toutefois pas parfait car 2 à 3 % de l’oxygène est transformé en espèces réactives de l’oxygène (ERO) particulièrement réactionnelles, leur nature instable confère une certaine toxicité par interaction avec toute une série de substances biologique importantes (lipides, protéines et acides nucléiques) (Pincemail *et al.*, 2002; Bonnefont-Rousselot *et al.*, 2003; Buonocore *et al.*, 2010).

**2. Le stress oxydant**

**2.1. Définition et facteurs déclenchant**

Dans des conditions physiologiques, la production des ERO est parfaitement maîtrisée par les systèmes de défense de notre organisme: la balance antioxydants /pro-oxydants est en équilibre. Le stress oxydant résultera d’une situation où l’organisme ne contrôle plus la présence excessive de radicaux oxygénés toxiques (figure 3). Il est potentiellement impliqué dans le développement du vieillissement ou de pathologies associées au vieillissement (maladies cardio-vasculaires et neurodégénératives, cancer, diabète, dégénérescence maculaire, asthme, ...) (Hops *et al.*, 2010).



**Figure 3.** Production des antioxydants et des radicaux libres durant (A) des conditions normales et (B) un stress oxydant (Santhosh Kumar et Priyadarsini, 2014)

Comme le montre le tableau 5, les sources de stress oxydant peuvent avoir diverses origines endogènes et exogènes.

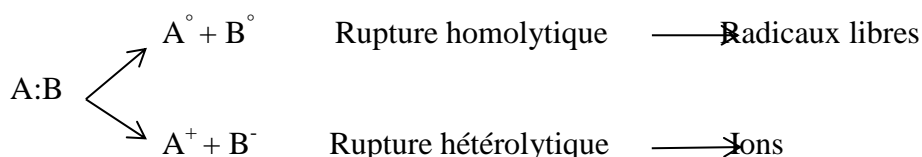
**Tableau 5.** Facteurs déclenchant le stress oxydant (Migliore et Coppédé, 2009).

<b>Mode de vie</b>	Tabagisme, faible consommation en fruits et légumes Alcool, médicaments Pilule contraceptive Exposition au soleil Exercice intense ou mal géré
<b>Environnement</b>	Pollution, ozone Amiante, radiations Contacts avec des substances cancérogènes
<b>Mécanismes biochimiques</b>	Xanthine-oxydase (ischémie-reperfusion) Inflammation, altération de la fonction endothéliale Surcharge en fer, oxydation de l'hémoglobine Altérations mitochondriales, biosynthèse des prostaglandines Interventions chirurgicales (Circulation extracorporelle, transplantations)

**2.2. Les radicaux libres (RL)**

**2.2.1. Définition**

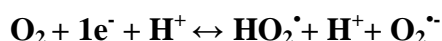
Un radical libre est défini comme une molécule possédant un ou plusieurs électrons libres. Le plus souvent l'électron non apparié se trouve sur l'orbitale externe de la molécule. Cet électron libre la rend très réactive. Ces radicaux peuvent se former par réduction mono électronique ou par rupture homolytique, durant laquelle les deux électrons dans la liaison covalente clivée sont divisés à parts égales entre les atomes (Bonfont-Rousselot *et al.*, 2003; Borg *et al.*, 2008).



**2.2.2. Types et sources**

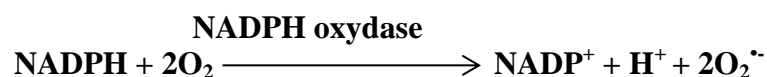
**a. Radicaux superoxyde (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>)**

Les radicaux superoxydes O<sub>2</sub><sup>•-</sup> sont des radicaux relativement peu réactifs par eux-mêmes, mais dont la toxicité provient du fait qu'ils peuvent donner naissance à des composés plus réactifs. De plus, la forme protonée du radical O<sub>2</sub><sup>•-</sup> est le radical hydroperoxyde HO<sub>2</sub><sup>•</sup> qui est beaucoup plus réactive que O<sub>2</sub><sup>•-</sup> même s'il est en proportion relativement faible (1%) à pH physiologique 7.4 (Bonfont-Rousselot *et al.*, 2003; Buonocore *et al.*, 2010).



✓ Enzymes

De nombreuses enzymes peuvent réduire O<sub>2</sub> en O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, par ailleurs, on prend comme exemples des oxydases qui peuvent être à l'origine de ces radicaux la xanthine oxydase et la NADPH oxydase (Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate oxydase) ou NOX. La première intervient au cours de phénomènes d'ischémie reperfusion (IR). Cette situation peut se rencontrer lors des greffes d'organes au cours desquelles le greffon est placé en situation d'ischémie puis de reperfusion lorsque la circulation sanguine est rétablie, mais aussi lors des processus de thrombose, le rétablissement de la circulation sanguine, apporte de l'oxygène aux tissus précédemment ischémies. Dans ces conditions: présence d'oxygène, d'hypoxanthine et de xanthine oxydase, le radical superoxyde est formé ainsi que la production d'acide urique (Bonfont-Rousselot *et al.*, 2003; Borg *et al.*, 2008). La NADPH oxydase constitue, quant à elle, un complexe enzymatique situé sur la membrane des cellules phagocytaires; elle comporte du FAD (Flavine Adénine Dinucléotide) et un cytochrome de type b capable de réduire O<sub>2</sub> en radical superoxyde, selon la réaction globale:



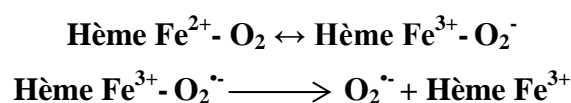
Cette étape de production d'O<sub>2</sub><sup>•-</sup> constitue une étape précoce dans le processus de phagocytose, puisque des réactions ultérieures interviennent, conduisent à la formation d'autre ERO détruisant la cellule étrangère (Curtin *et al.*, 2002).

✓ Réaction d'autooxydation

Plusieurs composés, tels que le glycéraldéhyde, l'adrénaline, la noradrénaline, la L-DOPA (3,4-dihydroxyphénylalanine), la dopamine, des thiols, le FMNH<sub>2</sub> (Flavine Mononucléotide réduite), le FADH<sub>2</sub> (Flavine Adénine Dinucléotide réduit), ...etc. sont susceptibles de s'oxyder facilement en présence d'oxygène en transférant simultanément un électron sur la molécule d'O<sub>2</sub>, conduisant ainsi au O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, ces réactions peuvent être accélérées par des métaux de trace (Bonfont-Rousselot *et al.*, 2003).

✓ Protéines héminiques

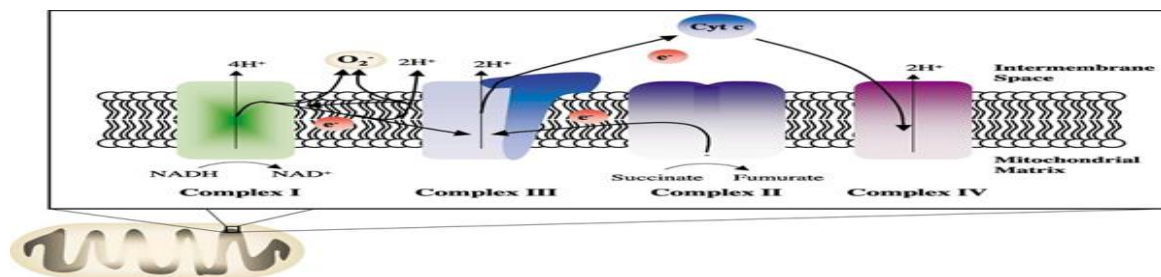
L'oxydation de l'hème constitue une route importante pour la génération de superoxyde, l'hémoglobine et la myoglobine, capables de fixer l'oxygène au niveau de leur noyau héminique (Fe<sup>2+</sup>), peuvent subir une oxydation en présence d'oxygène:



La forme oxydée (dénommée respectivement méthémoglobine ou méthyoglobine) est incapable de transporter l’oxygène et donc inefficace d’un point de vue fonctionnel constitue environ 3% de l’hémoglobine des hématies humaines (Buonocore *et al.*, 2010).

✓ Mitochondrie

La mitochondrie est l’organite des eucaryotes responsable de la respiration aérobie et constitue la source la plus principale de génération des ERO (95-98%) (figure 4). Plus de 2% d’O<sub>2</sub> consommé est converti en O<sub>2</sub><sup>•-</sup> par transfert de 1 à 2% d’électrons par la chaîne de transport d’électrons complexe I, NADH (Nicotinamide Adenine Dinucleotide)-ubiquinone oxydoreductase et complexe II, ubiquinol cytochrome C oxydoreductase sont les 2 sites de production d’O<sub>2</sub><sup>•-</sup> produits principalement dans la matrice mitochondriale (Curtin *et al.*, 2002; Migliore et Coppédé, 2009).



**Figure 4.** Chaîne de transport des électrons mitochondriale et sites de production d’O<sub>2</sub><sup>•-</sup> (Curtin *et al.*, 2002)

✓ Réticulum endoplasmique (RE)

Au sein du réticulum endoplasmique (les microsomes) se trouve le cytochrome P 450. Il s’agit d’une hydroxylase qui intervient dans le métabolisme des stéroïdes et des médicaments. Le fer présent à l’intérieur de ce cytochrome est susceptible de réagir avec l’oxygène et de produire l’anion superoxyde déclenchant la peroxydation lipidique (Cash *et al.*, 2007; Borg *et al.*, 2008).

✓ Noyau

La membrane nucléaire contient une chaîne de transport d’électrons, dont le rôle reste inconnu elle peut laisser échapper un certain nombre d’électrons susceptibles de réduire l’O<sub>2</sub> en O<sub>2</sub><sup>•-</sup> pouvant endommager l’ADN nucléaire (Bonfont-Rousselot *et al.*, 2003).

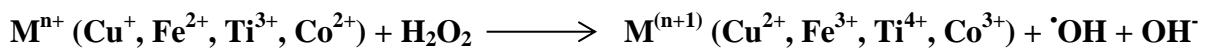
**b. Radicaux hydroxyle (•OH)**

Les radicaux hydroxyles sont les radicaux libres les plus réactifs, capables de réagir avec un très grand nombre de biomolécules. Ils ne diffusent pas et réagissent sur le lieu même de leur production, avec des constantes de vitesse très élevées (de l’ordre de 10<sup>9</sup> à 10<sup>10</sup>

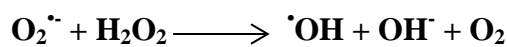
mol<sup>-1</sup>.l.s<sup>-7</sup>) avec une demi-vie biologique de 10<sup>-9</sup>s. Ils se forment *in vivo* soit en présence de cation métallique (réaction de Fenton), soit par d'autres voies (Buonocore *et al.*, 2010).

✓ Réaction de fenton

Les réactions de fenton sont décrites comme des réactions d'ions métalliques avec le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Le fer peut également catalyser la transformation de l'anion superoxyde en présence d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> avec production de radical hydroxyle selon la réaction dite de Haber –Weiss, cette réaction est relativement lente et moins courante que la précédente dans les tissus vivants (Curtin *et al.*, 2002; Borg *et al.*, 2008).



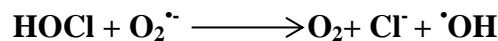
**Réaction de fenton**



**Réaction de Haber-Weiss**

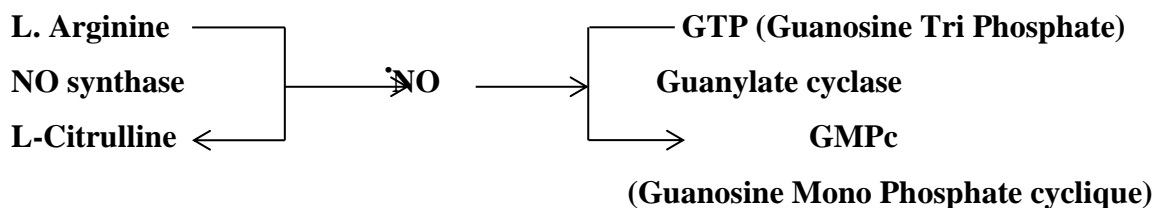
✓ Autres sources

Les radiations ionisantes, le rayonnement ultraviolet et les ultrasons sont également générateurs des radicaux  $\cdot OH$ . De plus, l'acide hypochloreux, généré notamment lors de la phagocytose par action de la myéloperoxydase, peut aussi conduire à la formation de ces radicaux (Bonfont-Rousselot *et al.*, 2003).



**c. Monoxyde d'azote radicalaire ( $\cdot NO$ )**

Le monoxyde d'azote radicalaire est un radical libre ubiquitaire synthétisé à partir de l'arginine grâce à l'action d'enzymes NO synthase (NOS) (Curtin *et al.*, 2002), selon le schéma suivant:



Le  $\cdot NO$  est présente dans un grand nombre des cellules du corps (vaisseaux, neurones, muscles squelettiques, macrophages...). Il est impliqué dans plusieurs fonctions cellulaires, cette implication dépend du site de production, il agit comme un agent vasodilatateur, un neurotransmetteur et participe à la réponse immunitaire. Toutefois, le  $\cdot NO$  peut former avec l'anion superoxyde, le peroxyde nitrite (HOONO), un oxydant puissant et diffusible, capable d'endommager de nombreuses molécules organiques (Haleng *et al.*, 2007; Migliore et Coppede, 2009).

**d. Composés oxygénés non radicalaires**

## ✓ Acide hypochloreux (HOCL)

Les neutrophiles circulants possèdent une myéloperoxydase qui utilise le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) comme substrat pour produire l'acide hypochloreux (OCL<sup>-</sup>), ce dernier est un bactéricide puissant, car il est à l'origine des radicaux libres auxquels les bactéries sont très sensibles (Borg *et al.*, 2008).

## ✓ Peroxyde d'hydrogène

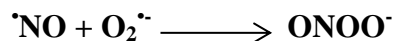
C'est un composé relativement peu réactif en l'absence des métaux de transition, capable de diffuser rapidement à travers les membranes cellulaires. Il peut être produit selon deux grandes voies; l'action d'oxydases et la dismutation du radical O<sub>2</sub><sup>•-</sup> (Bonfont-Rousselot *et al.*, 2003).

✓ Oxygène singulet (<sup>1</sup>ΔgO<sub>2</sub>)

L'oxygène singulet n'est qu'une forme activée de l'oxygène, résultant d'une inversion de spin d'un des électrons de l'orbitale externe. Il est responsable des réactions de photosensibilisation: certaines cellules, illuminées à une certaine longueur d'onde d'absorbent de l'énergie, passent alors à un état excité, et leur énergie d'activation peut être transférée à des molécules d'oxygène adjacentes (Buonocore *et al.*, 2010).

✓ Peroxynitrite (ONOO<sup>-</sup>)

Le peroxynitrite est un oxydant puissant, résultant de la réaction du radical <sup>•</sup>NO avec le superoxyde (Bonfont-Rousselot *et al.*, 2003).

**2.2.3. Physiologie****a. Rôles physiologiques bénéfiques**

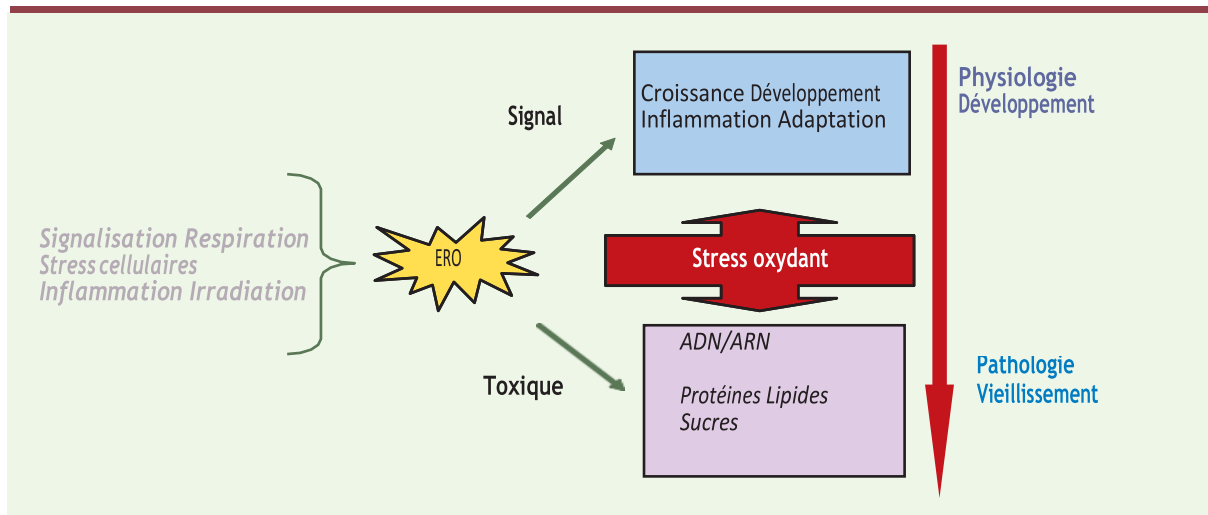
Survient quand les ERO sont produites en faible quantité. Elles interviennent dans :

- la régulation de l'apoptose (suicide programmée des cellules malades);
- la phagocytose des bactéries;
- les cascades de signalisation, la transmission de signaux;
- la régulation de la dilatation capillaire;
- la modulation des gènes codant les enzymes anti-oxydantes;
- la fécondation (Les spermatozoïdes produisent des ERO pour percer la paroi de l'ovule);
- ils jouent un rôle très important pendant la gestation. Ceux-ci interviennent dans la fusion des membranes, permettant la nidation de l'œuf fécondé et le remodelage des tissus utérins, placentaires et embryonnaires, la mise en place des vaisseaux sanguins propres à la gestation,

la mise en place des cotylédons et la perméabilisation des membranes qui autorise l'afflux intense de nutriments en direction du fœtus (Curtin *et al.*, 2002; Aurousseau *et al.* 2004; Seifried *et al.*, 2007; Buonocore *et al.*, 2010).

**b. Effets toxiques**

Survient quand elles sont produites en excès générant un stress oxydant et provoquant des dommages cellulaires par oxydation des molécules biologiques (Migliore et Coppédé, 2009), la figure 5 illustre la double vie des ERO.



**Figure 5.** La double vie des ERO (Barouki, 2006)

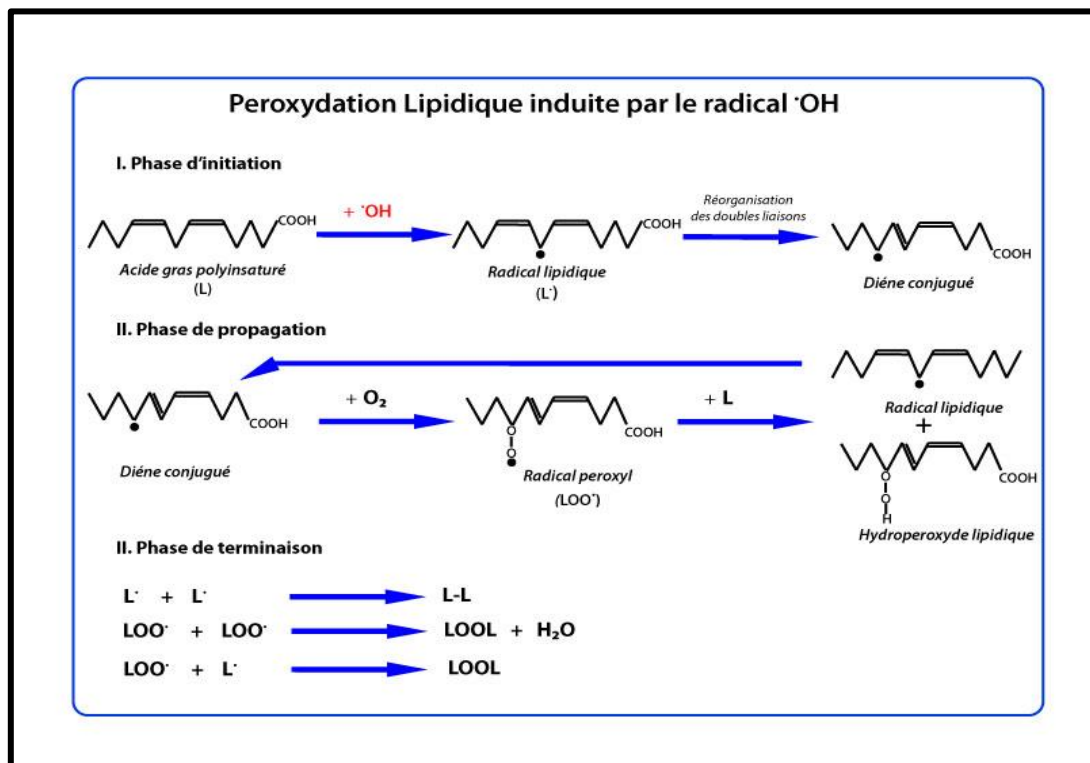
**b.1. La peroxydation lipidique**

Les membranes cellulaires constituent les premiers cibles pour les radicaux libres circulants ainsi que les lipoprotéines à cause de leurs richesse en acides gras polyinsaturés (AGPI), mais aussi le système nerveux central à cause de sa grande consommation d’oxygène, de la faiblesse en enzymes antioxydantes et surtout de la grande concentration en lipides. La peroxydation lipidique se déroule en plusieurs étapes :

- ✓ l’initiation: dans laquelle un AGPI est attaqué au niveau d’un carbone situé entre deux doubles liaisons par un radical hydroxyle avec arrachement d’un atome d’hydrogène qui laisse un électron non apparié, ensuite il subira une suite de réarrangements des doubles liaisons (Pelmont, 2008);
- ✓ la stabilisation: cette étape permet la formation d’un diène conjugué  $RO_2^{\bullet}$  par coordination avec une molécule d’oxygène;
- ✓ la propagation: les alkoxy et peroxy radicaux propagent l’oxydation par l’intermédiaire de  $RO_2^{\bullet}$ ;
- ✓ la terminaison: la réaction en chaîne se termine au moment de la recombinaison de

deux diènes ou s'il y a réduction des hydroperoxydes par la glutathion peroxydase ou la vitamine E. Les principaux produits résultant de la peroxydation des lipides sont: les malondialdéhydes (MDA), le 4hydroxyalkénel (4HDA), et le 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE) et qui sont eux-mêmes des oxydants qui réagissent préférentiellement avec certains acides aminés (Borg *et al.*, 2008; Buonocore *et al.*, 2010).

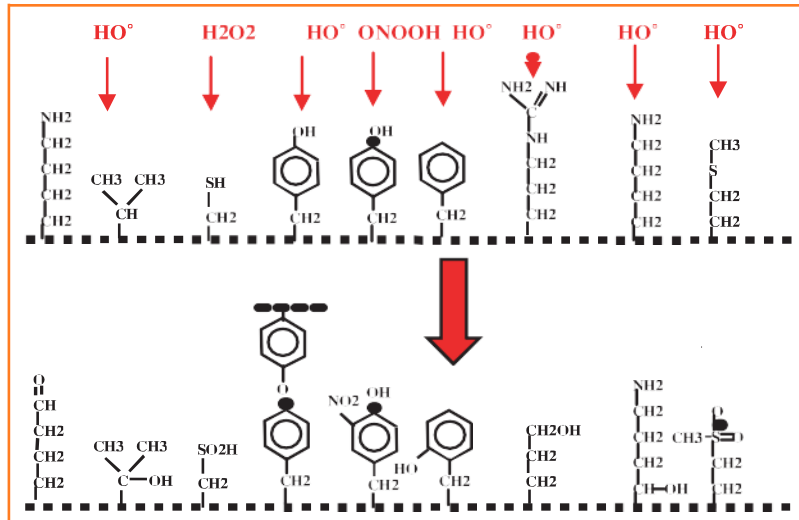
La figure 6 présente les différentes étapes de la peroxydation lipidique:



**Figure 6.** Mécanisme en chaîne de la peroxydation des acides gras polyinsaturés et nature des produits terminaux formés (Favier, 2003)

**b.2. L'oxydation des protéines**

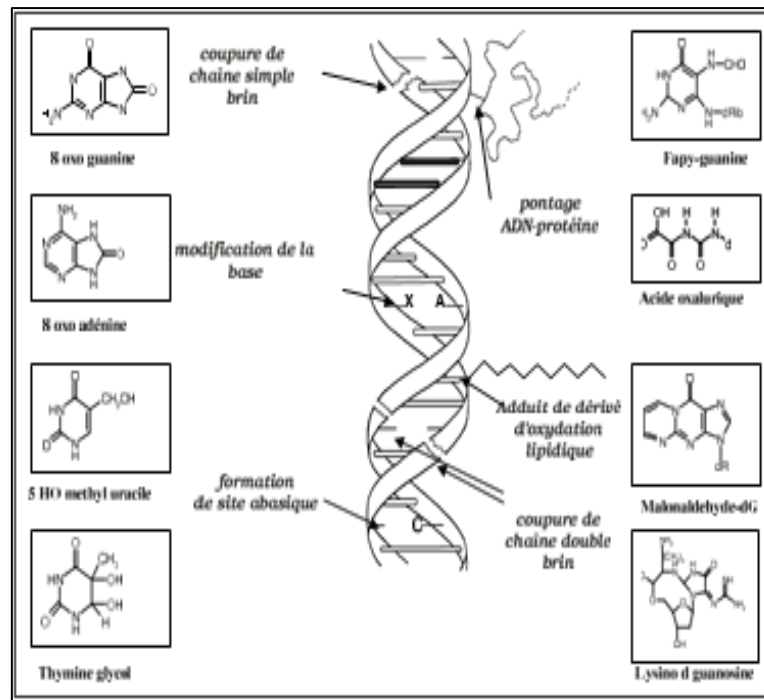
Les acides aminés des protéines sont la cible des radicaux libres soit au niveau de leur chaîne latérale, avec formation de produit d'oxydation, soit au niveau de la liaison peptidique entraînant la fragmentation de la chaîne, et ceux qui sont plus sensibles aux radicaux libres sont: les acides aminés aromatiques (Tyr: tyrosine, Try: tryptophane) et soufrés (Cys: cystéine, Met: méthionine) ainsi que l'histidine et la proline (figure 7) (Haleng *et al.*, 2007).



**Figure 7.** Nature de quelques modifications des chaînes latérales d'acides aminés des protéines après attaque radicalaire (Favier, 2003)

**b.3. L'oxydation des acides nucléiques:**

Les bases et les désoxyriboses de l'ADN sont la cible privilégiée des radicaux libres et leur oxydation modifie la base, si bien qu'elle ne peut plus s'apparier avec la base adéquate ce qui provoque des mutations, comme elle peut aboutir à la transversion des bases GC (guanine et cytosine) et TA (adénine et thymine) par l'addition de  $\cdot\text{OH}$  sur l'un des doubles liaisons de l'un des produits d'oxydation qui dérive de la guanine: la 8-oxo-7-hydrodésoxyguanine qui s'apparie fréquemment avec la base A, les radicaux libres peuvent aussi causer des cassures au double brin de l'ADN conduisant à des altérations du message génétique impliquées dans le déclenchement du cancer et du vieillissement (figure 8) (Bonnefont-Rousselot, 2003).



**Figure 8.** Lésions de l’ADN formées par attaque radicalaire du patrimoine génétique des cellules (Favier, 2003)

**b.4. L’oxydation des glucides**

La chimie de l’attaque radicalaire des polysaccharides a été beaucoup moins étudiée que celle des autres macromolécules, il n’en demeure pas moins que les espèces réactives de l’oxygène attaquent les mucopolysaccharides et notamment les protéoglycanes du cartilage. Par ailleurs, le glucose peut s’oxyder dans des conditions physiologiques, en présence de traces métalliques, en libérant des cétoaldéhydes, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et OH•, qui entraîneront la coupure de protéines ou leur glycation par attachement du cétoaldéhyde, formant un dérivé AGE (Advanced Glycation Endproducts). Ce phénomène de glycosoxydation est très important chez les diabétiques et contribue à la fragilité de leurs parois vasculaires et de leur rétine (Favier, 2003).

**2.3. Systèmes de défense antioxydant**

Les systèmes de défense antioxydants comportent:

- des enzymes;
- des protéines (transferrine, haptoglobine, métallothionéine), qui diminuent la disponibilité des pro-oxydants tels que les ions Fe<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Cu<sup>+</sup>;
- des protéines, comme les protéines de choc thermique;
- des composés de basse poids moléculaire (glutathion, α- tocophérol, acide ascorbique, bilirubine, acide urique) (Bonfont-Rousselot *et al.*, 2003).

**2.3.1. Les antioxydants plus que des piègeurs d'ERO**

Les antioxydants sont des molécules qui possèdent des propriétés allant bien au-delà de leur capacité à piéger les ERO (Ricciarelli *et al.*, 2002). Expérimentalement, il est bien prouvé que les antioxydants présentent des activités anticancéreuses non seulement en piégeant des ERO mais aussi en augmentant la réponse immunitaire, en diminuant l'expression d'oncogènes ou en inhibant l'angiogenèse des tumeurs ainsi que leur rôle clé dans la régulation des signaux cellulaires (Pincemail *et al.*, 2002).

**2.3.2. Les antioxydants comme agents de prévention**

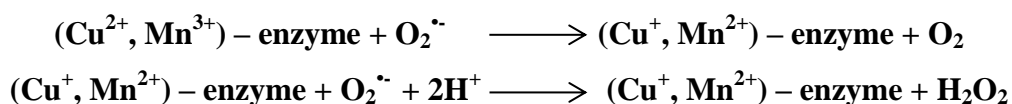
Plusieurs études tant épidémiologiques que cliniques indiquent que des personnes présentant des concentrations sanguines faibles en antioxydants sont plus à risque, de développer des maladies cardiovasculaires que des sujets ayant un bilan antioxydant bien équilibré (Gutteridge, 1993). Un bel exemple est de la vitamine C entraînant une amélioration des fonctions vasomotrices des cellules endothéliales de l'artère radicale (Hornig *et al.*, 1998).

**2.3.3. Système enzymatique**

**a. Superoxyde dismutase (SOD)**

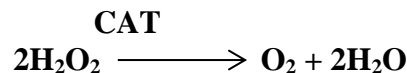
Ce sont des métalloenzymes présentes chez tous les organismes mis au contact de l'oxygène, avec l'exception notoire des lactobacilles. Elles catalysent la dismutation du superoxyde en le transformant en peroxyde d'hydrogène et en oxygène, avec une rapidité qui est une des plus élevées connues. Sa plus grande utilité physiologique est peut-être d'éviter la réaction de fenton (Pelmont, 2008). Chez l'homme, on décrit plusieurs isoenzymes SOD qui se différencient par la localisation chromosomique du gène, leur contenu métallique, leur structure quaternaire ainsi que leur localisation cellulaire: la Cu/Zn-SOD<sub>1</sub> cytosolique, la Mn-SOD<sub>2</sub> mitochondriale et la Cu/Zn-SOD<sub>3</sub> extracellulaire, qui est sécrétée par les cellules musculaires lisses et constitue le système antioxydant majeur de la paroi artérielle. Chez les bactéries, il existe aussi la Fe-SOD (Haling *et al.*, 2007).

Concernant la Cu/Zn-SOD, le cuivre et le zinc forment un noyau bimétallique, le premier ayant le rôle catalytique principal, l'autre étant structural et remplaçable par d'autres métaux (Pelmont, 2008).



**b. Catalase (CAT)**

Enzyme de type hémoprotéine à fer, de couleur verte, capable de catalyser la décomposition d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Cette enzyme sert donc à métaboliser l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produit par certaines réactions d'oxydation de substrats tels que: acides aminés, acides gras, purine,..... etc, catalysées essentiellement par des flavoprotéines en présence d'O<sub>2</sub>. Elle permet ainsi l'oxydation de nombreux composés réduits tel que: l'alcool, phénol,..... etc. Elle est également présente chez de nombreuses bactéries (Morère et Pujol, 2003).



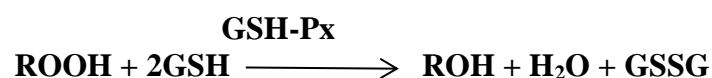
**c. Peroxydases**

Les peroxydases sont des enzymes capable de détoxifier le peroxyde d'hydrogène et d'autre hydroperoxydes, en couplant la réduction de l'hydroperoxyde avec l'oxydation d'un substrat réducteur. Ainsi, il est possible de distinguer des glutathion peroxydases, des cytochrome C peroxydases et des NADH peroxydases (Bonnenfont – Rousselot *et al.*, 2003).

- ✓ La glutathion peroxydase (GSH-Px)

La GSH-Px est un tétramère dont la structure tridimensionnelle est connue, et contient du sélénium dans la sélénocystéine. Elle est considérée comme enzyme de défense essentielle des organismes animaux contre les peroxydes (Baldwin *et al.*, 1995; Arthur, 2000).

La GSH-Px catalyse la dismutation d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en eau et en oxygène moléculaire, le glutathion sous forme réduite, GSH, est oxydé en GSSG (Zhu *et al.*, 2008). Elle est en compétition avec la CAT car elles utilisent toutes les deux le même substrat : H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, cette enzyme étant active pour des faibles concentrations d'ERO (Valko *et al.*, 2007).



D'un point de vue structural, les GSH-Px présentent une ou quatre sous unités, selon l'isoforme. Chaque sous-unité de poids moléculaire compris entre 19 et 24,8 kDa contient un atome de Se sous forme de sélénocystéine. Elles varient avec leur localisation dans l'organisme. À l'intérieur des cellules, il est possible de distinguer la forme cytosolique et mitochondriale (cGSH-Px) de la forme membranaire (PH-GSH-Px: Phospholipide hydroperoxyde Peroxydase) (Poisson, 2013).

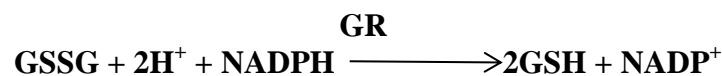
Chez les eucaryotes, il existe 5 isoenzymes:

- ✓ la GSH-Px 1, l'isoforme la plus fréquente, est exprimée dans de nombreuses cellules telles que les érythrocytes, les cellules hépatiques et rénales et est présente dans le cytoplasme et la mitochondrie;

- ✓ la GSH-Px 2 dite gastro-intestinale car localisée préférentiellement dans les cellules épithéliales du tractus gastro-intestinal;
- ✓ la GSH-Px 3 présente au niveau plasmatique;
- ✓ la GSH-Px 4 présente dans les cellules épithéliales du rein et dans les testicules est située à l'interface de la membrane interne et du cytoplasme;
- ✓ la GSH-Px 5 localisée dans l'épididyme (Poisson, 2013).

**d. Glutathion réductase (GR)**

C'est une flavoprotéine dimère comportant deux thiols réversiblement oxydables dans son site actif, elle catalyse la réduction du GSSG en GSH (Pelmont, 2008).



**e. Glutathion S-transférase (GST)**

Enzyme à large spécificité et largement répandu, catalysant:



où R est aromatique, aliphatique, hétérocyclique, X étant un halogène, un groupe nitrite ou sulfate. L'enzyme lie aussi le glutathion à diverses cibles électrophiles, des époxydes et des oxydes d'arènes, elle a aussi le pouvoir de fonctionner comme isomérase, peroxydase. En liant le glutathion à de nombreux composants, la transférase possède une grande importance comme agent de détoxification, notamment dans la neutralisation des herbicides et insecticides par des bactéries, plantes et insectes, son activité est souvent responsable des phénomènes de résistance (Sheehan *et al.*, 2001).

**f. Hème oxygénase (HO)**

Le système enzymatique hème oxygénase est le facteur limitant du catabolisme de l'hème. Trois isoformes ont été caractérisées mais seules HO-1 et HO-2 sont fonctionnelles et capables de générer le monoxyde de carbone (CO), la biliverdine, rapidement transformée en bilirubine et du fer libre qui conduit à l'induction de la ferritine. L'induction de l'activité HO-1 génère ces produits de dégradation de l'hème qui assurent une importante cytoprotection. L'HO-1 est à présent considérée comme ayant trois activités majeures: antioxydante, antiinflammatoire, antiapoptotique auxquelles s'ajoute un rôle dans le maintien de la microcirculation. Les activités de HO-1, particulièrement celles antioxydantes, dépendent en premier lieu des métabolites de l'hème libérés par l'enzyme; toutefois, un rôle indirect antioxydant de HO-1 lui-même a été clairement démontré dans au moins deux situations : la cellule macrophagique et le syndrome d'IR. Dans les cellules macrophagiques, l'hème est

indispensable à la maturation de la sous-unité catalytique gp 91 de la NADPH-oxydase. Cette enzyme est l'élément majeur de la production d'anion superoxyde. Dès lors, la consommation de l'hème par HO-1 empêche la maturation de la NADPH-oxydase, ce qui diminue très fortement la production de  $(O_2\bullet)$  par l'enzyme. Au cours du syndrome d'IR, l'activation du système HO-1 contribue indirectement à protéger les tissus du stress oxydatif (Taille *et al.*, 2004; Lyoumi *et al.*, 2007).

### **g. Système thiorédoxine**

L'antioxydant majeur responsable du maintien des protéines à l'état réduit est la thiorédoxine qui sera régénérée par le NADPH sous l'action de la thiorédoxine réductase (TrxR) qui possède un groupement sélénocystéine dans son site actif. Elle intervient dans la dégradation des peroxydes lipidiques et d' $H_2O_2$ , ainsi que dans la régénération du radical ascorbyl en acide ascorbique (Haleng *et al.*, 2007).

### **2.3.4. Système non enzymatique**

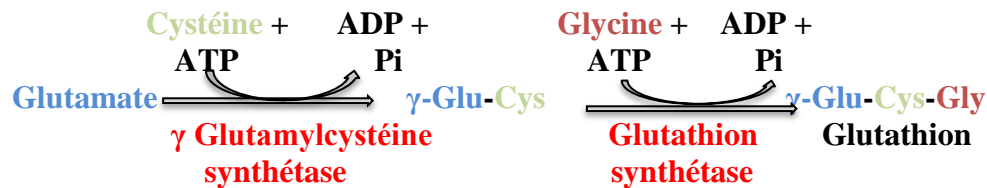
#### **a. Antioxydant hydrosolubles**

✓ L'acide ascorbique

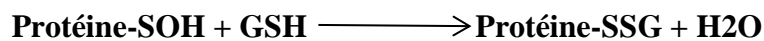
La vitamine C ou l'acide ascorbique est la lactone de l'acide L-cétogulonique dont la plupart des mammifères sont capables de la synthétiser dans leur foie ou leurs reins. Ce n'est pas le cas de l'homme qui doit assurer un apport journalier d'environ 100 mg. Elle est avant tout, un excellent piègeur des ERO. Elle inhibe également la peroxydation lipidique en régénérant la vitamine E à partir de la forme radicalaire. Ses fonctions sont nombreuses: contribution au bon fonctionnement du système immunitaire, implication dans la synthèse du collagène et des globules rouges, ainsi que dans les mécanismes de métabolisme du fer, du glutathion, des hormones stéroïdes, des acides aminés aromatiques et des catécholamines (Adrian *et al.*, 1995; Haleng *et al.*, 2007).

✓ Le glutathion et les protéines thiols

Le glutathion est un tripeptide (L- $\gamma$  glutamyl-L-cystéinyl-glycine), ubiquiste. Il est le thiol (-SH) majoritaire au niveau intracellulaire (l'albumine étant son équivalent plasmatique) où il est présent sous forme essentiellement réduite. Dans des conditions physiologiques, sa forme oxydée est en concentration très faible. Le GSH est synthétisé en deux étapes, par la  $\gamma$  glutamylcystéine synthétase ( $\gamma$ -GCS) et la GSH synthétase (GS) qui complète la molécule avec la glycine. Ces deux réactions (ci-dessous) sont couplées avec une hydrolyse d'ATP (Adénosine Tri Phosphate) en ADP (Adénosine Di Phosphate) et phosphate (Pelmont, 2008).



Le groupement thiol permet au glutathion d'intervenir dans de nombreuses réactions de réduction. Il participe également aux réactions de détoxification des ERO, notamment H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et aussi lors de la détoxification des xénobiotiques électrophiles. De plus, via sa fonction thiol, le glutathion participe au maintien de l'équilibre redox cellulaire impliqué dans la régulation de différentes voies métaboliques (transduction de signal, expression génique des facteurs de transcription) selon la réaction suivante appelée glutathionylation :

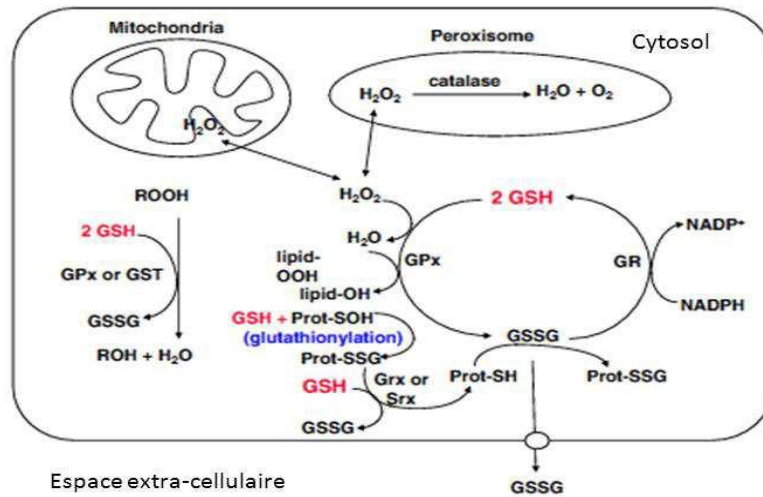


générant des protéines glutathionylées (Lu, 2013; Poisson, 2013).

Le rapport GSH/GSSG est considéré comme un excellent marqueur de la peroxydation lipidique et permet d'objectiver l'importance du stress. Au cours du vieillissement et lors d'un exercice intense, ce rapport tend à diminuer (Haleng *et al.*, 2007).

Cependant, la fonction thiol peut également entraîner la formation des radicaux thiyles (GS•) qui pourront à leur tour générer de nouveaux radicaux libres. Le glutathion agit comme un antioxydant notamment au niveau mitochondrial ; en présence de GSH-Px dépendante du sélénium, il réduit le peroxyde d'hydrogène prévenant tout effet délétère tel que la peroxydation lipidique. Le glutathion sert ainsi de cofacteur à la GSH-Px, comme c'est le cas pour la GST, de chélateur des métaux de transition, il permet aussi la régénération de différents antioxydants dont les vitamines C et E. Le glutathion est également impliqué dans les processus d'apoptose et de division cellulaire (Lu 2013; Poisson, 2013) et intervient aussi dans le transport de certains acides aminés dont la cystéine (Pastore *et al.*, 2003). L'apport recommandé journalier est d'environ 300 mg (Haleng *et al.*, 2007).

La Figure 9 illustre les différentes réactions antioxydantes mettant en jeu le glutathion.



**Figure 9.** Les réactions impliquant le glutathion (Lu, 2013, Poisson, 2013)

Grx : Glutaredoxines ;

Srx : Sulphiredoxines

La plupart des protéines dont l’albumine contiennent des groupements « thiols » qui possèdent des propriétés réductrices et piègent facilement les espèces oxygénées activées (Haleng *et al.*, 2007).

✓ L’acide urique

Produit terminal majeur du métabolisme des purines chez l’homme, il est à pH physiologique majoritairement ionisé sous forme d’urate, un piègeur puissant des radicaux ( $\cdot\text{OH}$ ,  $\text{ROO}\cdot$ ,  $\text{NOO}\cdot$ ...). Ces réactions conduisent à des espèces radicalaires qui seront à leur tour réduites (notamment par la vitamine C). Les propriétés antioxydantes de l’urate in vivo peuvent être appréciées indirectement par le fait qu’un produit de la réaction d’urate avec les ERO, l’allantoïne, est présent à des taux élevés lors d’un stress oxydant (Bonnefont-Rousselot *et al.*, 2003).

✓ Les polyphénols

Ils constituent une famille importante d’antioxydants présents dans les végétaux. L’alimentation fournit environ 1g de polyphénols par jour principalement par l’apport en fruits et dans une moindre mesure en légumes et en céréales. Ils sont présents sous forme d’anthocyanine dans les fruits rouges, sous forme de flavonoïdes dans les agrumes, l’huile de lin et sous forme d’épicatéchine dans le thé, le chocolat, les pommes, les oignons et les algues brunes. Globalement, ce sont d’excellents piègeurs des ERO et de très bons chélateurs des métaux de transition comme le fer et le cuivre (Bonnefont-Rousselot *et al.*, 2003; Haleng *et al.*, 2007).

✓ Les oligoéléments

L'importance des éléments de trace (zinc, cuivre, manganèse, sélénium) dans la défense antiradicalaire, avec notamment leur participation comme cofacteurs des enzymes anti-oxydantes (Morère et Pujol, 2003).

**b. Antioxydants liposolubles**

## ✓ La vitamine E

D'un point de vue biologique, deux isomères sont particulièrement intéressants, l' $\alpha$ - et le  $\gamma$ -tocophérol. Leur caractère hydrophobe leur permet de s'insérer au sein des membranes riches en acides gras polyinsaturés, où ils jouent un rôle protecteur en réagissant avec les radicaux peroxy ( $\text{ROO}\cdot$ ) pour former un radical tocophéryle, empêchant ainsi la propagation de la peroxydation lipidique (Pelmont, 2008).

## ✓ Les caroténoïdes

Les caroténoïdes, dont font partie le  $\beta$ -carotène ou provitamine A car, après hydrolyse hépatique, il donne naissance à deux molécules de vitamine A et le lycopène, pigment rouge présent notamment dans la tomate et le pamplemousse. Ils peuvent piéger l'oxygène singulet, notons aussi la capacité de  $\beta$ -carotène de piéger des radicaux peroxy et protéger ainsi les LDL (low density lipoprotein) (Niki, 2010).

✓ Le Coenzyme  $\text{Q}_{10}$ 

Le coenzyme  $\text{Q}_{10}$ , appelé ubiquinone, est un dérivé benzoquinolique avec une longue chaîne latérale isoprénique. Cette chaîne latérale confère à la molécule un caractère lipophile qui lui permet de s'insérer dans les membranes et les lipoprotéines. Il joue un rôle essentiel dans la chaîne mitochondriale de transport d'électrons et est un puissant inhibiteur de peroxydation lipidique, en synergie avec la vitamine E. S'il n'existe pas d'apport journalier recommandé pour cet antioxydant, il semble toutefois qu'il soit nécessaire d'en ingérer au moins 30 mg par jour (Haleng *et al.*, 2007; Niki, 2010).

Citons aussi le rôle antioxydant des hormones sexuelles (les œstrogènes), la mélatonine et la bilirubine (Bonfont-Rousselot, 2003), la figure ci-dessous montre les principales sources des ERO ainsi que les antioxydants les plus impliqués.

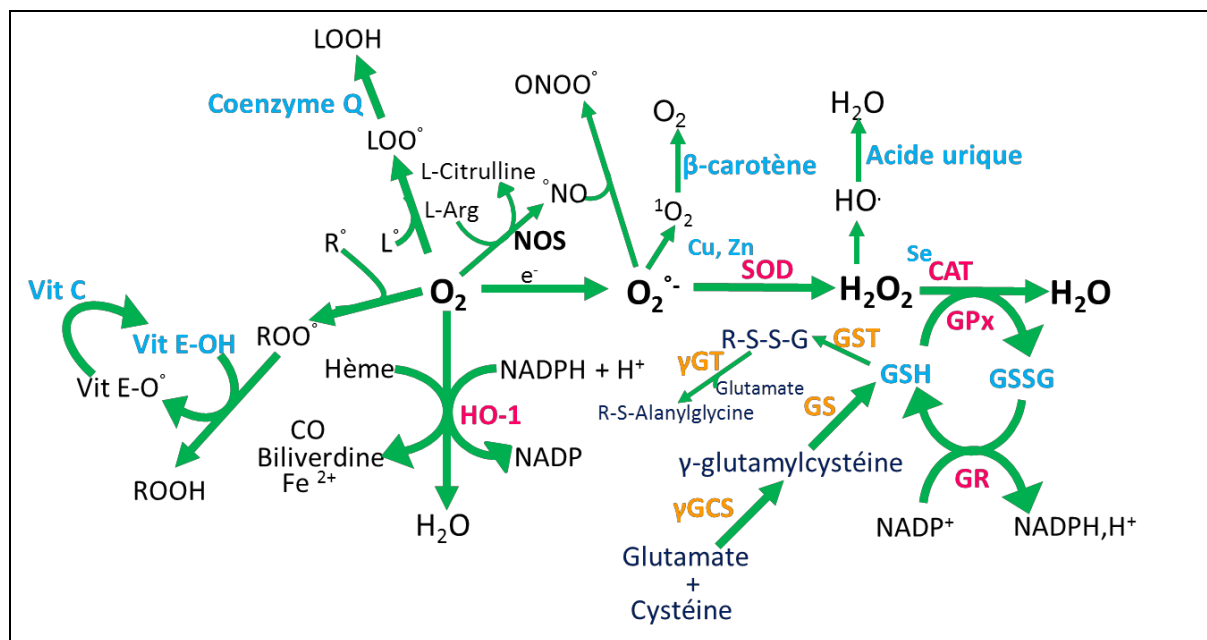


Figure 10. Les antioxydants (Poisson, 2013)

## 2.4. Stress oxydant et transmission cellulaire

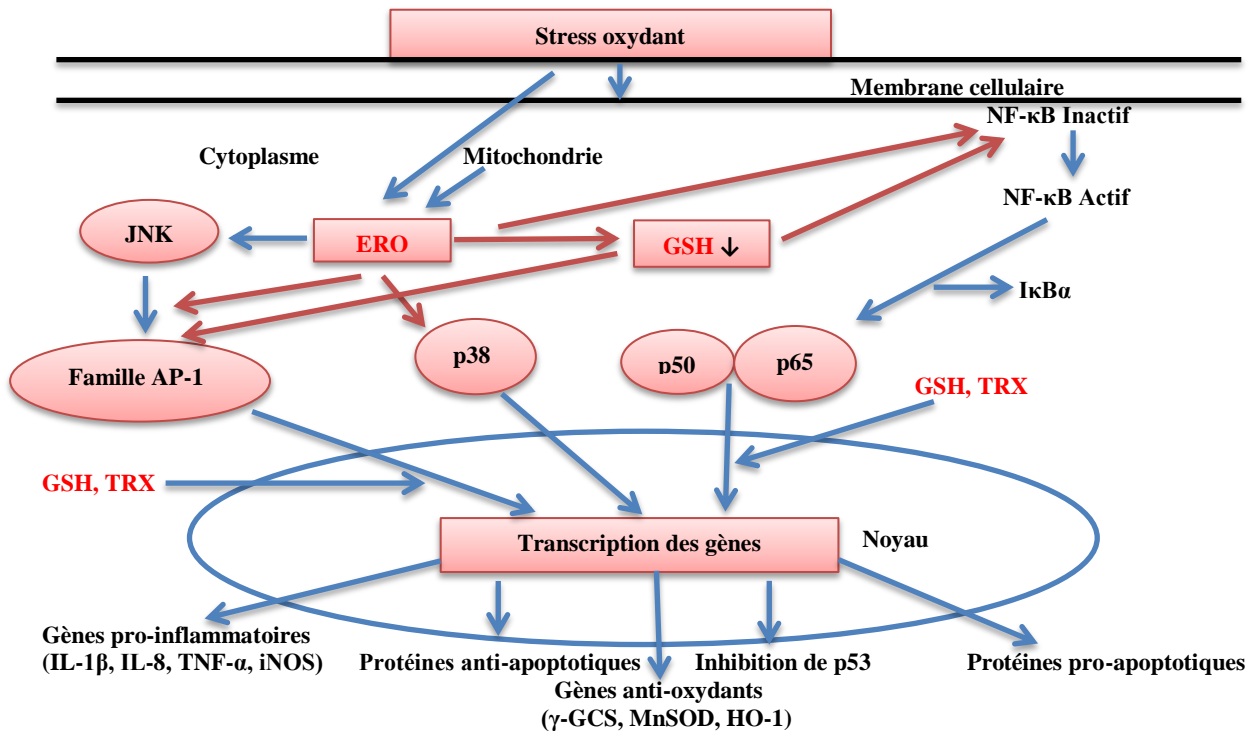
La transduction signalétique ou la signalisation cellulaire sont des processus qui permettent à une information d'être transmise de l'extérieur de la cellule à différents éléments fonctionnels localisés à l'intérieur de celle-ci. Les signaux envoyés à l'appareil transcriptionnel, responsable de l'expression de certains gènes, sont normalement transmis vers le noyau de la cellule par une classe de protéines appelées facteurs de transcriptions. Ceux-ci se lient à des séquences spécifiques de l'ADN pour réguler l'activité de l'ARN polymérase II. Ces processus de signalisation peuvent induire diverses activités biologiques comme la contraction musculaire, l'expression de gènes, la croissance cellulaire et la neurotransmission. Récemment, de nombreux travaux ont démontré que de nombreuses réactions d'oxydo-réduction (état rédox) dans la cellule sont impliquées dans la régulation de plusieurs fonctions cellulaires. Selon la nature et la quantité d'espèces réactives de l'oxygène produites, leur source et cinétique de production dans la cellule, on distingue de différentes conséquences dans la régulation cellulaire par les ERO (Pincemail *et al.*, 2001).

### 2.4.1. Les facteurs de transcription activés par le stress oxydant

- ✓ NF-κB (Nuclear Factor κB)
- ✓ AP-1 (Activator Protein 1)
- ✓ AP-2 (Activator Protein 2)
- ✓ MTF (Metal-responsive transcription factor)
- ✓ HSF (Heat Shock Factor)

2.4.2. Facteurs de transcription inhibés par le stress oxydant

- ✓ Sp-1 (specificity protein 1)
- ✓ NFI (Nuclear Factor 1)
- ✓ p53 (protéine 53)



**Figure 11.** Rôle central des espèces oxygénées activées et du glutathion dans la régulation rédox de la transcription des gènes (Pincemail *et al.*, 2001)

IL-1β, IL-8: Interleukine-1beta, Interleukine 8 respectivement ;  
 iNOS: inducible nitric oxide synthase ;  
 JNK: Jun kinases ;  
 TNF-α: Tumor Necrosis Factor-α.

2.5. Conséquences physiopathologiques du stress oxydatif

2.5.1. Théorie radicalaire du vieillissement

Décrite dans les années 50 par Harman (1956), la théorie radicalaire du vieillissement explique que les phénomènes de dégénérescence liés au vieillissement sont dus à l'accumulation d'éléments oxydés et à leurs conséquences sur l'organisme comme la peroxydation lipidique ou la carbonylation des protéines. Ainsi, plus l'âge augmente, plus les attaques radicalaires sur les différentes cibles biologiques seront importantes. La théorie radicalaire du vieillissement serait impliquée dans de nombreuses pathologies telles que diabète de type II, les maladies neurodégénératives (dont les maladies d'Alzheimer et de Parkinson) et l'athérosclérose (Poisson, 2013). Le tableau 6 représente des marqueurs d'oxydation mis en évidence dans les pathologies.

**Tableau 6.** Biomarqueurs de stress oxydant associés à des pathologies (Valko 2007; Poisson, 2013)

Pathologies humaines	Biomarqueurs de stress oxydant							
	MDA	GSH/GSSG	Acroléine	F2-Isoprostanes	4-HNE	8-OH-dGuanosine	AGE	Protéines carbonylées
Cancer	x	x	x			x		
Maladies Cardiovasculaires		x	x		x			
Arthrite rhumatoïde		x		x				
Maladie d'Alzheimer	x	x		x			x	
Maladie de Parkinson		x			x			x
Ischémie/Reperfusion		x		x				
Athérosclérose	x		x	x	x			
Diabète non insulino-dépendant	x	x		x			x	

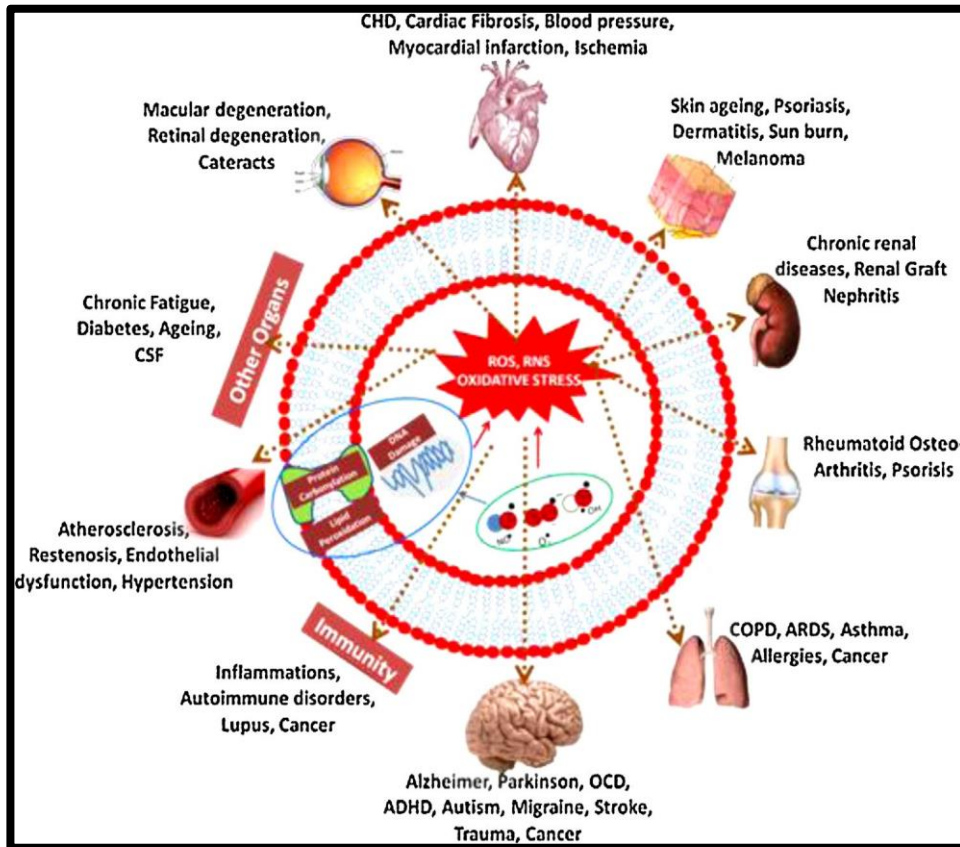
**2.5.2. Pathologies chroniques liées à un excès d'ERO**

La production excessive d'espèces réactives a été identifiée comme étant impliquée dans certaines pathologies. Ces pathologies peuvent se diviser en deux groupes : le premier regroupant celles liées principalement à une production excessive d'ERO au niveau mitochondrial telles que le cancer ou le diabète type 2; le second concerne les cas où une stimulation excessive des NOX ou de la xanthine oxydase entraîne une augmentation de la production d'espèces radicalaires.

Dans ce dernier groupe, une forte composante inflammatoire est également décrite.

Les pathologies chroniques concernées sont notamment les maladies cardiovasculaires (l'athérosclérose, maladies cardiaques ischémiques) ou neurodégénératives (maladie d'Alzheimer, de Parkinson) et la polyarthrite rhumatoïde (Droge 2002 ; Valko *et al.*

2007, Poisson, 2013). La figure 12 illustre les principales maladies qui peuvent être causées par un stress oxydant:



**Figure 12.** Surproduction des radicaux libres provoque un stress oxydant affectant différents organes ou systèmes (Santhosh Kumar et Priyadarsini, 2014)

- ADHD: Attention Deficit Hyperactivity Disorder ;
- ARDS: Acute Respiratory Distress Syndrome;
- CHD: Coronary Heart Disease ;
- COPD Chronic Obstructive Pulmonary Disease ;
- CSF: Chronic Fatigue Syndrome ;
- OCD: Obsessive-Compulsive Disorder ;
- RNS: Reactive Nitrogen Species ;
- ROS: Reactive Oxygen Species

***CHAPITRE III :***  
***LA VITAMINE E ET LE***  
***SÉLÉNIUM***

## 1. La vitamine E

### 1.1. Historique

En 1922, Evans et Bishop constataient que l'absence d'un facteur alimentaire liposoluble, présent dans les feuilles vertes et les germes de blé, se traduisait par l'arrêt de la reproduction chez le rat blanc par la mort des fœtus chez la rate gestante et l'altération de l'épithélium séminifère chez le male. Il fallait attendre 15 ans pour qu'Evans livre les premières préparations, à partir de germes de blé, de ce qu'il était convenu d'appeler la vitamine E ou de fécondité, ou du grecque tocophérol (Tokos: accouchement, pherein: porter, ol: alcool). En 1968, elle a été reconnue comme un élément nutritif essentiel pour l'homme par Food and Nutrition Board of National Research Council des États-Unis (Magnin, 1992; Feki *et al.*, 2001).

### 1.2. Structure chimique

La vitamine E est un terme générique qui regroupe 8 molécules différentes: 4 tocophérols et 4 tocotriénols. La structure de base est formée par un noyau hydroxychromane sur lequel est fixée une chaîne polyisoprénique à 16 carbones, saturée (tocophérols) ou tri-insaturée en 3', 7' et 11' (tocotriénols). La molécule de vitamine E présente 3 centres de chiralité, en position 2 sur le noyau chromane et en position 4' et 8' sur la chaîne latérale, toujours de configuration R dans les produits naturels. Les divers tocophérols et tocotriénols se distinguent entre eux par le nombre et la position des groupements méthyles sur le noyau aromatique. Les composés  $\alpha$  portent 3 méthyles en position 5, 7 et 8; les composés  $\beta$  et  $\gamma$  en portent 2 respectivement en positions 5, 8 et 7, 8; les composés  $\delta$  portent un seul méthyle en position 8 (figure 13). Parmi ces 8 composés, l' $\alpha$ -tocophérol est le constituant majoritaire et celui qui présente l'activité biologique la plus élevée (Cuvelier *et al.*, 2003; Guillard et Lequeu, 2009 ).

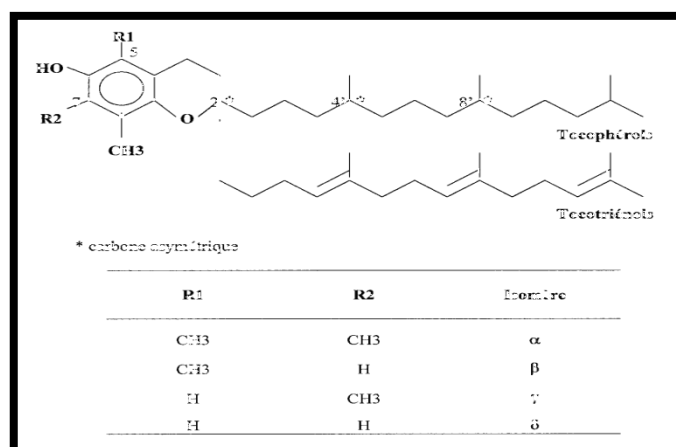


Figure 13. Structure et nomenclature de la vitamine E (Feki *et al.*, 2001)

1.3. Biosynthèse, sources alimentaires et utilisations

1.3.1. Biosynthèse

La biosynthèse de la vitamine E s'effectue dans les plantes, les algues et certaines plantes non photosynthétiques telles que les champignons mais pas chez les animaux. Il existe vraisemblablement 2 voies de synthèse conduisant à la formation de la vitamine E, la voie des tocotriénols et la voie des tocophérols selon la figure ci-dessous:

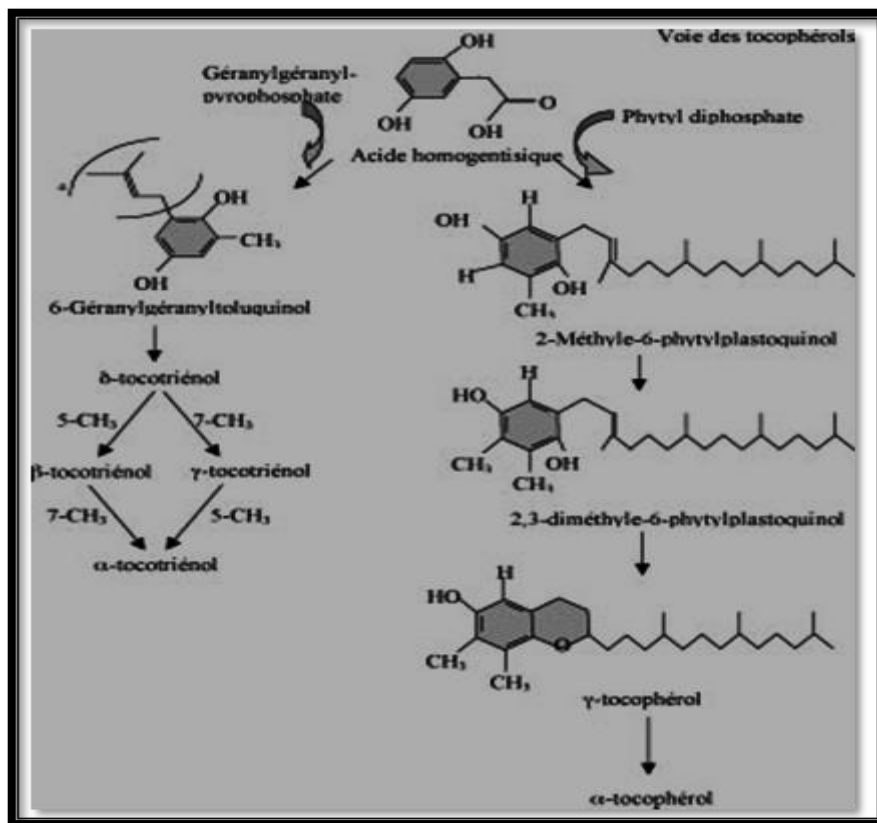


Figure 14. Les principales étapes de la biosynthèse de la vitamine E (Cuvelier *et al.*, 2003)

1.3.2. Sources alimentaires et besoin

Comme la majorité des vitamines, la vitamine E n'est pas synthétisée par l'organisme et doit être apportée par l'alimentation. Les germes de céréales, les huiles végétales et les légumes verts (salade, choux, épinard) sont les sources naturelles les plus riches en vitamine E. Les produits d'origine animale en sont moins riches: on en trouve surtout dans les poissons gras, le foie, les œufs et les produits laitiers (Magnin, 1992; Feki *et al.*, 2001). La teneur relative en vitamine E des principales sources naturelles est présentée dans le tableau 7.

L'activité vitaminique E peut être exprimée en unité internationale (UI), correspondant à 1 mg d'α-tocophérol acétate ou mieux en α-tocophérol équivalent (α-TE), correspondant à 1 mg, qui est la forme biologique la plus active (1 α-TE = 1,49 UI). L'activité vitaminique

respective des  $\beta$ ,  $\gamma$  et  $\delta$  tocophérols n'est que d'environ 30 %, 15 % et 10 % de celle de l' $\alpha$ -tocophérol. Une alimentation équilibrée couvre habituellement les besoins en vitamine E. Ces besoins augmentent avec la teneur des aliments en lipides, notamment en acides gras insaturés. L'apport quotidien recommandé augmente avec l'âge et dans certains états physiologiques comme la grossesse et l'allaitement (Feki *et al.*, 2001).

**Tableau 7.** Teneur relative en vitamine E (mg acétate  $\alpha$ -tocophérol (UI)/100 g) des différentes sources naturelles (Le Grusse et Watier, 1993)

<b>Huile de germe de blé</b>	150 – 250	<b>Noix, pistaches</b>	5 – 10
<b>Huile de soja</b>	120 – 150	<b>Beurre</b>	1.5 – 3
<b>Huile de tournesol</b>	50 – 80	<b>Foie de veau</b>	1.2 – 1.6
<b>Noisettes, amandes</b>	20 – 30	<b>Poissons gras</b>	1.0 – 2.0
<b>Huile d'arachide</b>	15 – 30	<b>Œufs de poule</b>	0.7 – 1.6
<b>Germes de céréales</b>	14 – 16	<b>Lait de femme</b>	0.6 – 0.7
<b>Huile d'olive</b>	10 – 20	<b>Légumes verts</b>	0.3 – 2.5
<b>Margarine</b>	8 – 40	<b>Lait de vache</b>	0.1 – 0.2

1 UI = 1 mg d' $\alpha$ -tocophérol acétate; 1  $\alpha$ -tocophérol équivalent ( $\alpha$ -TE) = 1 mg d' $\alpha$ -tocophérol; 1  $\alpha$ -TE = 1,49 UI. (Apports quotidiens recommandés (AQR) = 15 à 18 UI).

### 1.3.3. Utilisations

La vitamine E, une vitamine ubiquitaire apporte aux membranes et aux tissus, de la protection qu'elle leur confère contre la nécrose et la fibrose et à la dérive antioxydatrice qu'elle développe à ces niveaux, en sauvegardant l'activité respiratoire mitochondriale et le métabolisme membranaire. Outre, son usage contre l'oxygénothérapie, en particulier chez les insuffisants respiratoires, il convient de souligner l'intérêt de son administration chez les sujets atteints de pathologies dégénératives, comme les myopathies, le cancer, les encéphalopathies, l'athérosclérose et les maladies hémolytiques. Mais sa meilleure exploitation, semble s'imposer comme agent thérapeutique de prévention dans un mode soumis aux pollutions et aux stress multiples (Magnin, 1992).

### 1.4. Absorption et répartition dans l'organisme

L' $\alpha$ -tocophérol chemine dans les canaux lymphatiques jusqu'à la circulation générale, véhiculé par les chylomicrons. Sa résorption intestinale est préalablement liée à la digestion des graisses par sels biliaires et lipase pancréatique interposés. Une fois déversé dans le plasma, le tocophérol est pris en charge par les lipoprotéines et plus spécialement les LDL qui assurent la plus grande partie de cette charge. Le produit est ensuite stocké dans les graisses de l'organisme et le foie, avec une répartition très large au niveau de tous les tissus.

Plus de 50% de la vitamine E se trouvent dans les tissus adipeux à la concentration de 300µg/g de triglycérides. Sa concentration plasmatique varie de 8 à 13µg/ml et le muscle en contient de 10 à 20 µg/g de tissu.

Certains sites de fixation du tocophérol ont même été décelés dans les globules rouges et dans le foie, à types de récepteurs protéiques. Le tocophérol libre se trouve dans les fèces et la bile. Il existe sous forme conjuguée dans les urines (Magnin, 1992; Pincemail *et al.*, 1998; Feki *et al.*, 2001).

## **1.5. Activité biologique et activité antioxydante**

### **1.5.1. Activité antioxydante**

Grace à leur caractère hydrophobe, la vitamine E présente dans les membranes biologiques et les lipoprotéines circulantes agit en captant les radicaux peroxytes, prévenant la propagation du processus de la lipoperoxydation. La réaction des radicaux peroxytes est 104 à 105 fois plus rapide avec les tocophérols qu'avec les AGPI. Le noyau chromane réagit avec les radicaux peroxytes (LOO•) pour générer un tocopheroxyte ( $\alpha$ -TO•) et un hydroperoxyde (LOOH). Le radical tocopheroxyte formé est très instable, il réagit avec un 2<sup>ème</sup> radical peroxyte pour donner naissance à d'autres produits moins réactifs tels que la tocophéryl-quinone ( $\alpha$ -TQ•). La teneur membranaire en vitamine E étant faible par rapport aux lipides et à la production des radicaux, seule l'existence d'un mécanisme de renouvellement de l' $\alpha$ -tocophérol permet d'expliquer son efficacité. En effet, de nombreux composés comme l'acide ascorbique, le glutathion réduit, l'ubiquinol et l'acide lipoïque participent à la régénération de la vitamine E (Pincemail *et al.*, 1998; Feki *et al.*, 2001; Guillard et Lequeu, 2009 ).

### **1.5.2. Activité stabilisatrice de membrane**

Cette activité serait indépendante de l'activité antioxydante. Elle résulterait de la participation du tocophérol à la formation des phospholipides membranaires. L'ensemble de ces propriétés expliquerait que l'on attribue à la carence en tocophérol de nombreux dysfonctionnements enzymatiques, en particulier de ceux réglant la respiration cellulaire (Magnin, 1992).

### **1.5.3. Activités liées aux plaquettes et aux globules rouges**

L'action de la vitamine E semble importante sur les éléments figures du sang. On attribue à la carence en tocophérol la susceptibilité hémolytique des hématies, l'anémie macrocytaires, la sensibilité élevée des hématies aux oxydants et leur fragilisation, toutes manifestations qui cèdent au traitement substitutif. On prête aussi au tocophérol de participer à la synthèse de l'hème du globule rouge en modulant la formation de l'hémoglobine ainsi que des systèmes enzymatiques spécifiques tels que les cytochromes

et les catalases.

A l'égard des plaquettes, le déficit en tocophérol à ce niveau pourrait être responsable d'une modification de la synthèse plaquettaire des prostaglandines, de la diminution de la perméabilité des membranes aux cations et de nombreux accidents à type de thromboses et thrombocytoses, ainsi que d'hyperagrégation plaquettaire à la thrombine et au collagène (Landrieu, 1987; Magnin, 1992).

#### **1.5.4. Action sur la croissance et la différenciation cellulaire**

De nombreuses preuves expérimentales suggèrent que la vitamine E joue un rôle dans la croissance et la différenciation cellulaire. La supplémentation d'isomères ou de dérivés de la vitamine E inhibe la prolifération des cellules tumorales, des cellules musculaires lisses et des lymphocytes T. L'effet antiprolifératif de la vitamine E pourrait résulter de l'action exercée par la vitamine E sur les facteurs de transcription NF- $\kappa$ B et AP1 (Feki *et al.*, 2001).

#### **1.5.5. Vitamine E et fonction neurologique**

La vitamine E est un facteur indispensable au maintien des fonctions neurologiques normales. Un déficit sévère et prolongé en vitamine E conduit à un syndrome spino-cérébelleux d'installation progressive (Gordon, 2001) dont la physiopathologie n'est pas claire. Les effets antioxydant et stabilisant des membranes seraient, du moins en partie, à la base du rôle protecteur de la vitamine E dans le système nerveux (Muller et Goss-Sampson, 1990).

#### **1.5.6. Vitamine E et fonction immunitaire**

De nombreuses études expérimentales suggèrent que la vitamine E joue un rôle dans la modulation de la réponse immunitaire. Un statut marginal en vitamine E a été trouvé associé à une plus grande fréquence de maladies infectieuses (Chavance *et al.*, 1989) et de cancers. La supplémentation en vitamine E a permis d'améliorer la réponse immunitaire chez l'homme et le rat âgés (Wu *et al.*, 2000). La vitamine E a permis de réduire l'activité suppressive des lymphocytes T et d'augmenter la sécrétion d'interleukine 2 chez la souris infectée par le virus de l'immunodéficience murine (Wang *et al.*, 1994<sup>a</sup>). Certaines preuves indiquent la possibilité d'un effet bénéfique de la vitamine E et d'autres micronutriments sur la progression de l'infection à VIH (Virus d'immunodéficience humaine) et sur les symptômes cliniques du SIDA (Wang *et al.*, 1994<sup>b</sup>).

### **1.6. Carences**

La carence ou le déficit chronique en vitamine E semblent gouverner, en particulier

chez les organismes jeunes en développement, des manifestations essentiellement neurologiques ou des pathologies de membranes et sanguines. Ainsi signale-t-on des myopathies et des polyneuropathies chez le jeune enfant. Au niveau membranaire, la malabsorption des graisses et le déficit en transporteurs plasmatiques des lipoprotéines sont susceptibles de développer des pathologies de retentissement, au niveau du système nerveux central, du système cardiovasculaire, du foie et des reins. Sans négligeant les effets protecteurs des organes reproducteurs (Magnin, 1992).

## **2. Le sélénium**

### **2.1. Historique**

Du grec sélênê, « déesse de la lune » en raison de l'analogie de ses propriétés chimiques avec celles du tellure, le sélénium a été découvert au début par Klaproth, ensuite en 1818 par le chimiste Suédois Jöns Berzelius, dans un résidu de préparation de l'acide sulfurique (Berzelius, 1818). Schwarz et Foltz ont établi la valeur nutritionnelle du sélénium en 1957.

### **2.2. Présentation chimique**

De la famille des chalcogènes, le sélénium est un métalloïde du groupe de l'oxygène et un analogue de soufre, non métal de symbole Se, de numéro atomique 34 et de masse atomique 78.96. Il appartient au groupe 16 (ou VIA) de la classification périodique (Duvold, 1999; Sun *et al.*, 2014). Cet élément est présent dans l'écorce terrestre dans une moyenne de 90 µg/Kg dont les concentrations les plus importantes sont dans les roches carbonatées, les sols volcaniques et sédimentaires d'où l'accumulation dans des différentes plantes (Santhosh Kumar et Priyadarsini, 2014). Il existe de nombreux composés du sélénium de différentes valences : -2, +1, +2, +4, +6. Dans l'environnement, le sélénium peut être trouvé sous plusieurs états d'oxydation: -2 (séléniure), 0 (sélénium), +4 (sélénite) et +6 (séléniate) (Guillard, 2011).

### **2.3. Sources, besoins et utilisations**

#### **2.3.1. Sources**

Les teneurs en sélénium sont dans l'air ambiant de 0.1 à 10 ng.m<sup>-3</sup>, dans l'eau de 2 à 3 µg.L<sup>-1</sup>, dans les sols de 0.10 à 4.5 mg/kg et dans les sédiments de 0.10 à 5 mg/kg. Concernant les aliments consommés par l'homme, le sélénium existe principalement dans les plantes et la viande soit sous formes inorganiques: séléniure, sélénite et séléniate, soit sous formes organiques: sélénométhionine, méthylsélénocystéine et sélénocystéine. Les poissons, les fruits de mer et les abats constituent des sources très riches en sélénium. De plus, les céréales, les graines, les œufs, les légumes et les produits laitiers sont une autre source de sélénium. Mais le noyer d'Amazonie de Brésil reste la source la plus riche en cet élément. Le sélénoneine, un des

composés de sélénium, nouvellement découvert, se trouve dans les poulets, le thon et le maquereau (Guillard, 2011; Santhosh Kumar et Priyadarsini, 2014).

**2.3.2. Besoins**

Les valeurs nutritionnelles conseillées en sélénium et en autres nutriments ont été données par DRI (Dietary Reference Intake) et développées par FNB (Food National Academies Board). Une consommation élevée de cet élément peut causer un certain effet indésirable, pour cette raison, on cite dans le tableau 8 l'allocation diététique recommandée avec l'apport maximal tolérable (Otten *et al.*, 2006; Santhosh Kumar et Priyadarsini, 2014).

**Tableau 8.** Allocation diététique recommandée et apport maximal tolérable en sélénium (Otten *et al.*, 2006; Santhosh Kumar et Priyadarsini, 2014)

Age	Allocation diététique recommandée			Apport maximal tolérable (µg/jour)
	Males et females (µg/jour)	Grossesse (µg/jour)	Allaitement (µg/jour)	
0 – 6 mois	15	/	/	45
7 – 12 mois	20	/	/	60
1 – 3 ans	20	/	/	90
4 – 8 ans	30	/	/	150
9 – 13 ans	40	/	/	280
14 – 18 ans	55	60	70	400
> 19 ans	55	60	70	400

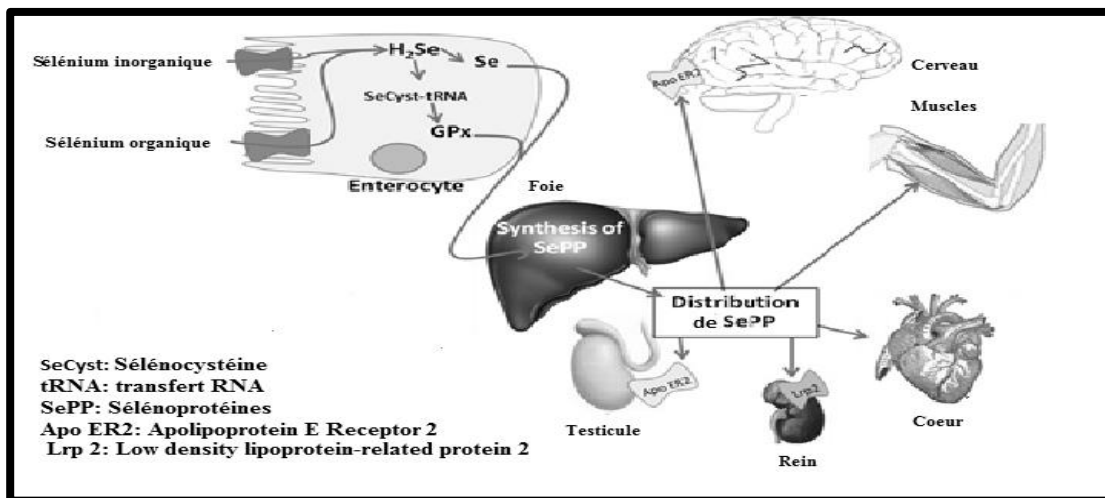
**2.3.3. Utilisations**

Le sélénium est utilisé dans l'industrie des composants électroniques (25%), des pigments (10 %), du verre (40 %), du caoutchouc, la métallurgie (10%), la biologie et l'agriculture (5%), les additifs alimentaires, les catalyseurs, les produits pharmaceutiques et les agents d'oxydation en chimie organique (10%) (Duvold, 1999; Guillard, 2011). En outre, l'implication du sélénium dans la médecine inclue l'utilisation de ses composés pour le diagnostic de certains cancers; pour le calcul de la demi-vie des plaquettes et du fibrinogène; dans l'exploitation de la fonction parathyroïdienne; dans l'exploration du pancréas; pour le calcul du turn-over des protéines; comme des antimétabolites ayant une activité antitumorale ainsi que leurs dérivés méthylés. Le sulfure de sélénium est utilisé dans le traitement des pellicules, de l'acné, de l'eczéma, de la dermatite séborrhéique et d'autres maladies de peau (Duvold, 1999).

**2.4. Absorption et répartition dans l'organisme**

Le sélénium est un micronutriment essentiel pour la majorité des espèces animales y compris l'homme. Dans la population générale, l'exposition au sélénium est essentiellement

orale, par ingestion d'eau de boisson ou de nourriture. L'absorption des différents composés est de l'ordre de 60 à 90 %. L'absorption des séléniates est plus importante que celle des sélérites. La distribution est similaire pour les dérivés organiques et inorganiques du sélénium. Dans le plasma, le sélénium se fixe essentiellement aux sélénoprotéines P, à la glutathion peroxydase et à l'albumine. Le sélénium se distribue dans le foie et les reins (figure 15), passe dans le lait maternel et le placenta. Les principales voies de métabolisation sont celles des formations et du catabolisme des protéines contenant du sélénium, de la réduction des séléniates par le glutathion après incorporation dans les érythrocytes. L'excrétion du sélénium est à la fois urinaire et fécale (Guillard, 2011; Sun *et al.*, 2014).



**Figure 15.** Représentation de l'absorption de sélénium, synthèse des sélénoprotéines P et distribution dans les différents organes (Santhosh Kumar et Priyadarsini, 2014)

## 2.5. Effets bénéfiques

### 2.5.1. Activité antioxydante

Le sélénium est nécessaire à de nombreuses enzymes en particulier l'hème oxydase, la glutathion peroxydase et la thiorédoxine réductase, impliquées dans les mécanismes de défense cellulaire contre le stress oxydatif, il joue donc un rôle fondamental en tant que cofacteur biologique de la glutathion peroxydase dans la lutte contre les radicaux libres. Chez l'homme, le sélénium sous forme de sélénocystéine constitue le site actif de la glutathion peroxydase, cette enzyme localisée à la fois dans le cytosol et les mitochondries a pour rôle de réduire, en présence de glutathion réduit, un grand nombre de peroxydes protégeant ainsi les membranes cellulaires, les acides nucléiques et les protéines contre la dégradation par les radicaux libres (Duvold, 1999; Guillard, 2011).

**2.5.2. Sélénium et maladies cardiovasculaires**

Des études ont montré que la supplémentation en sélénium peut réduire le risque associé aux maladies cardiovasculaires à cause de son rôle protecteur contre la peroxydation lipidique, l'agrégation plaquettaire et les processus d'inflammation (Ricetti *et al.*, 1999). Une diminution des concentrations plasmatiques de sélénium est liée à une augmentation de risque de mortalité par les maladies cardiovasculaires (Shargorodsky *et al.*, 2010). L'effet antithrombotique de sélénium a été mis en évidence par les interactions entre les plaquettes et les cellules endothéliales via la GSH-Px; le sélénium liée au GSH-Px 4 réduit les phospholipides hydroperoxydes, cette réduction empêche l'accumulation des LDL oxydées dans la paroi artérielle, ce qui pourra réduire l'agrégation plaquettaire (Imai et Nakagawa, 2003).

**2.5.3. Sélénium et système nerveux**

Une déficience en sélénium cause des changements irréversibles des neurones et des dommages cérébraux. Des études cliniques ont révélé qu'un déficit en sélénium conduit à des crises, une fatigue, la maladie de Parkinson et la maladie d'Alzheimer. La SePP1 a un rôle antioxydant au niveau des cellules nerveuses prévenant l'apoptose cellulaire due au stress oxydant (Santhosh Kumar et Priyadarsini, 2014).

**2.5.4. Sélénium et problèmes liés au tube digestif et à la thyroïde**

Une carence en sélénium peut induire des différents problèmes au niveau de l'appareil digestif et de la thyroïde. Une alimentation pauvre en sélénium peut causer une malabsorption concernant des autres éléments de trace dans le duodénum. Des études sur les mammifères ont trouvé que la GSH-Px2 gastro-intestinale protège contre la toxicité des hydroperoxydes lipidiques digérés. La GSH-Px2 est la sélénoprotéine la plus importante dans le côlon grâce à son activité antioxydante contre le cancer de ce dernier (Santhosh Kumar et Priyadarsini, 2014).

La sélénoenzyme iodothyronine désiodase joue un rôle crucial dans la catalyse de la mono-désiodation de la prohormone thyroxine (T4) en hormone thyroïdienne active triiodothyronine (T3) et la conversion du T3 reverse inactive en diiodothyronine. Le sélénium lié à la GSH-Px3 protège les cellules thyroïdiennes du peroxyde d'hydrogène généré par ces dernières (Santhosh Kumar et Priyadarsini, 2014).

**2.5.5. Sélénium et immunité**

De plus, le sélénium est un immunomodulateur. A dose faible il stimule le système immunitaire. A dose physiologique, il stimule (en particulier en tant que composant des sélénoprotéines) la formation des anticorps, la production de médiateurs (cytokines) et

l'activité de nombreuses cellules immunocompétentes telles que les lymphocytes T auxiliaires, T cytotoxiques, les cellules NK (Natural Killer),...etc. Une carence en sélénium peut contribuer à accroître la vulnérabilité aux infections bactériennes et aux maladies virales telles que la grippe, ainsi qu'à augmenter le risque de complications en cas d'infection (Duvold, 1999; Iglesias *et al.*, 2013).

#### **2.5.6. Sélénium et potentialité thérapeutique anticancéreuse**

La mise en évidence de telle propriété a suscité son utilisation contre le cancer comme agent thérapeutique et en nutrition préventive. Ce micronutriment pourrait inhiber la carcinogénèse, par augmentation de la réponse immunitaire primaire, en protégeant les cellules contre les oxydations aberrantes, et en diminuant la formation de métabolites cancérigènes. Il a un rôle comme inhibiteur de la croissance tumorale et comme toxique spécifique vis-à-vis des cellules tumorales. Un abaissement du sélénium sérique, est présenté comme un des facteurs favorisant la survenue de cancer de tube digestif, des poumons, de la prostate, de la peau, du foie, du mammaire et du pancréas chez l'homme et l'animal (Clark *et al.*, 1996; Duvold, 1999; Reid *et al.*, 2008).

#### **2.5.7. Autres effets bénéfiques**

Le sélénium se comporterait comme antimutagène, modulateur de la division cellulaire, cytotoxique à propriétés antiproliférantes, activateurs des macrophages, activateur de la respiration cellulaire, réducteur de la pathogénicité ou de la tumorigénicité d'agents viraux, radioprotecteur, et protecteur contre la toxicité des métaux lourds. L'élément possède un important effet protecteur contre les effets toxiques, au niveau cardiaque et rénal, de métaux lourds et minéraux tels le cadmium ou le mercure, arsenic, plomb, argent. Le sélénium peut prévenir ou traiter certaines pathologies telles que l'arthrite, la cataracte, la fibrose kystique, la dystrophie musculaire, le dysfonctionnement sexuel, le vieillissement. Il a présenté des effets thérapeutiques bénéfiques éventuels dans ces maladies : sclérose en plaques, la dystrophie musculaire de Duchenne, le diabète type 2, la cirrhose alcoolique, la mucoviscidose, l'insuffisance rénale, la malnutrition, la phénylcétonurie, l'hypofertilité et l'ulcère de l'estomac (Duvold, 1999; Ursini *et al.*, 1999; Kumar *et al.*, 2010; Steinbrenner *et al.*, 2011; Kourinou *et al.*, 2013).

***ETUDE***  
***EXPÉRIMENTALE***

***MATÉRIELS ET  
MÉTHODES***

## 1. Matériel biologique

### 1.1. Animaux d'élevage

Le matériel biologique de base que nous avons choisi est le rat blanc mâle *Rattus rattus* de la souche Wistar, provenant de l'institut Pasteur d'Alger. Ces rats sont des mammifères nocturnes de l'ordre des rongeurs. À leur arrivée, ils ont pesé entre 200 et 210 grammes. Au début de l'expérimentation et après deux semaines d'adaptation, leur poids a été en moyenne  $278 \pm 10$  grammes.

### 1.2. Enceinte d'élevage

Les animaux sont élevés dans des cages en polyéthylène, celles-ci sont tapissées d'une litière composée de copeaux de bois. Les cages ont été nettoyées et la litière changée une fois tous les deux jours. Les rats sont acclimatés aux conditions de l'animalerie, à une température de  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , une hygrométrie de 40% et une photopériode contrôlée (12 h/12 h). La nourriture apportée aux animaux est maintenue dans des mangeoires et confectionnée sous forme d'un mélange de maïs, de saccharose, de soja, de CMV (Compléments Minéraux et Vitaminiques) et d'huile. Les proportions constituant ce régime alimentaire énergétiquement équilibré sont détaillées dans le tableau 9. Quant à l'eau de boisson, elle est présentée dans des biberons *ad libitum*.

**Tableau 9.** Composition du régime alimentaire utilisé lors de l'expérimentation selon (Upreti *et al.*, 1989)

Matière primaire	Quantité en g/kg	Pourcentage (%)
Amidon (maïs)	420	42
Saccharose	210	21
Soja	320	32
CMV	30	3
Huile	20	2

## 2. Protocole expérimental

Les rats males ont été répartis aléatoirement en six lots de dix rats par chacun:

- Groupe 1 : rats témoins.
- Groupe 2 : rats traités par la vitamine E + Se, ils ont reçu conjointement le sélénium dans l'eau de boisson (1 mg/L) et une alimentation enrichie en vitamine E à une dose de 400 mg/kg.

- Groupe 3 : rats traités par l'AgNO<sub>3</sub>, ils ont reçu l'AgNO<sub>3</sub> dans leur eau de boisson (20 mg/L).
- Groupe 4 : rats traités par l'AgNO<sub>3</sub> + vitamine E, ils ont reçu simultanément l'AgNO<sub>3</sub> dans l'eau de boisson (20 mg/L) et une alimentation enrichie en vitamine E à une dose de 400 mg/kg.
- Groupe 5 : rats traités par l'AgNO<sub>3</sub> + Se, l'eau de boisson est supplémentée en AgNO<sub>3</sub> (20 mg/L) et Se (1 mg/L).
- Groupe 6 : rats traités par l'AgNO<sub>3</sub> + vitamine E + Se, ils ont reçu 400 mg de la vitamine E/kg d'aliment, AgNO<sub>3</sub> (20 mg/L) et Se (1 mg/L) dans l'eau de boisson.

L'eau de boisson et l'alimentation sont supplémentées en argent sous forme de nitrate d'argent (AgNO<sub>3</sub>), en sélénium sous forme de sélénite de sodium (Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>) et en vitamine E sous forme d' $\alpha$ -tocophérol durant 3 mois.

Durant toute la période d'expérience, la consommation quotidienne en eau et en aliment ainsi que le poids corporel ont été mesurés d'une façon régulière.

La dose d'AgNO<sub>3</sub> et la durée de traitement ont été sélectionnées selon l'agence de protection environnementale (EPA, 1980). De plus, les doses de la vitamine E et du sélénium utilisées ont été aussi choisies en basant sur d'autres études expérimentales de Kim *et al.* (2001) et Qingzhi *et al.* (2003) respectivement.

### **3. Sacrifice des animaux**

La dernière nuit avant le sacrifice qui a eu lieu après 90 jours d'expérimentation, les animaux sont mis à jeun pour éviter toute modification des paramètres biochimiques essentiellement la glycémie et le bilan lipidique. Le poids final de chaque rat a été noté le jour de sacrifice. Les rats sont sacrifiés par décapitation cervicale sans anesthésie pour éviter de les maintenir à un état de stress.

#### **3.1. Prélèvement sanguin**

Lors de sacrifice, le sang a été immédiatement recueilli sur deux types de tubes d'analyses biologiques polyéthylènes et étiquetés:

- ✓ tube sec: ce tube a été utilisé à fin d'analyser quelques paramètres biochimiques au niveau sérique. Au moment de prélèvement, les tubes doivent être mélangés doucement pour éviter les hémolyses. Ensuite, ils ont été gardés dans une glacière pour être transportés rapidement au niveau de laboratoire en effectuant une centrifugation de 3000 tours/min pendant 15 min. Le sérum a été séparé et réparti en plusieurs eppendorfs étiquetés qui ont à leur tours été conservés à -20 °C pour ne pas

altérer les paramètres à mesurer plutard à l'exception de la glycémie qui doit être mesurée le jour même grâce à sa sensibilité;

- ✓ tube EDTA (Éthylène Diamine Tétra-Acétique): le volume de sang doit être suffisant de façon à ne pas fausser l'analyse par un phénomène de dilution dans l'EDTA. Le tube doit être agité immédiatement par retournement successif de façon à bloquer la coagulation naturelle. Les échantillons ont été conservés au frais, ils ne peuvent pas être congelés. Ils ont été transmis le jour même au laboratoire d'analyses médicales d'Annaba pour effectuer l'examen hématologique: NFS (Numération-Formule Sanguine) qui est une étude quantitative (numération) et qualitative (formule) des différents éléments cellulaires du sang: les globules blancs (ou leucocytes), les globules rouges (ou hématies) et les plaquettes sanguines. Cet examen est effectué en utilisant un automate d'hématologie.

### **3.2. Dissection et prélèvement des organes**

Après la dissection, le foie, les reins, les testicules et le cerveau de chaque rat sont prélevés et sont débarrassés de l'excès de graisse à l'aide de l'eau physiologique. Ils sont alors préalablement pesés pour être ensuite divisés en deux portions afin de subir les étapes suivantes:

- ✓ préparation de l'homogénat: la première portion est conservée à -20 °C le jour de sacrifice en évitant tout changement de l'activité enzymatique ou des concentrations des marqueurs biologiques de stress oxydant à mesurer. Ainsi, les jours qui précèdent, nous avons procédé à une homogénéisation de 1 g de tissu dans 2 ml de tampon TBS (Tris Buffered Saline) dont la composition est de: 50 mM TRIS (trishydroxyméthylaminométhane) et 150 mM NaCl avec un pH 7.4 en utilisant un homogénéisateur. De plus, une centrifugation de 10.000 g pendant 15 min à 4°C est nécessaire pour éliminer les débris cellulaire, le surnageant obtenu est réparti en plusieurs eppendorfs puis conservé à -20 °C;
- ✓ préparation pour l'examen histologique: le deuxième fragment est immédiatement fixé dans une solution de formol 10% jusqu'à la réalisation des coupes histologiques.

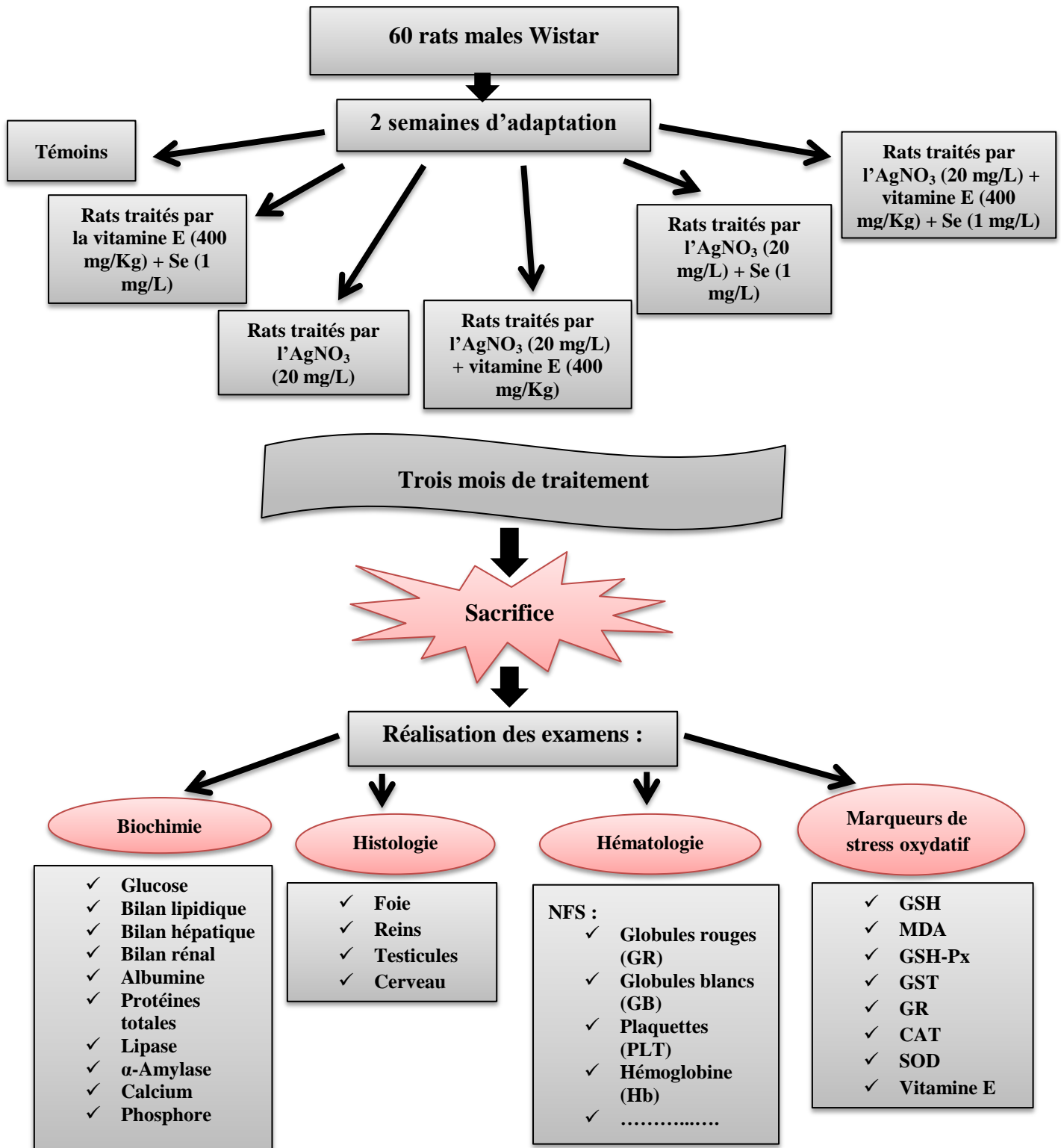
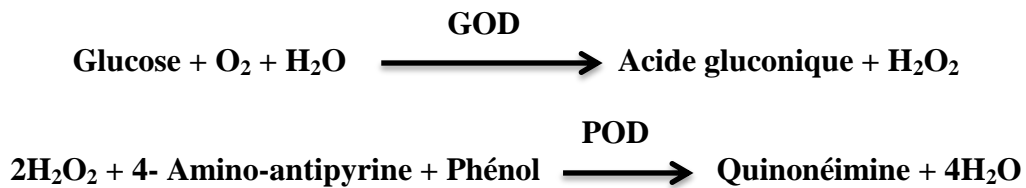


Figure 16. Illustration schématique de l'expérimentation

**4. Méthodes d'analyses biochimiques**

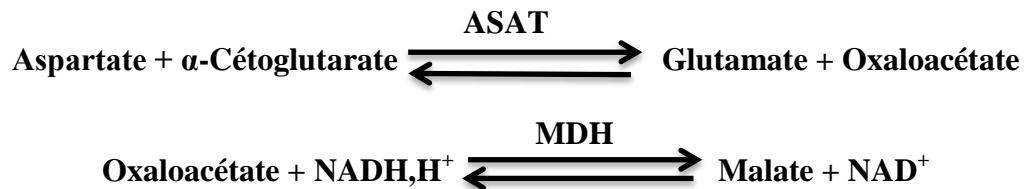
**4.1. Dosage du glucose (Kit RANDOX, United Kingdom)**

Le glucose sérique est déterminé par la méthode enzymatique et colorimétrique en présence d'une enzyme qui est la glucose oxydase (GOD). Le glucose est oxydé en acide gluconique et peroxyde d'hydrogène. Ce dernier, en présence de peroxydase (POD) et de phénol, oxyde le 4- amino-antipyrine (chromogène réduit incolore) en un produit coloré, la quinonéimine. L'intensité de la coloration rouge-violet obtenue est proportionnelle à la concentration en glucose présente dans l'échantillon. La lecture se fait en spectrophotométrie à une longueur d'onde de 500 nm (Tietz, 1990).



**4.2. Dosage de l'aspartate amino-transférase (ASAT) (Kit SPINREACT, Spain)**

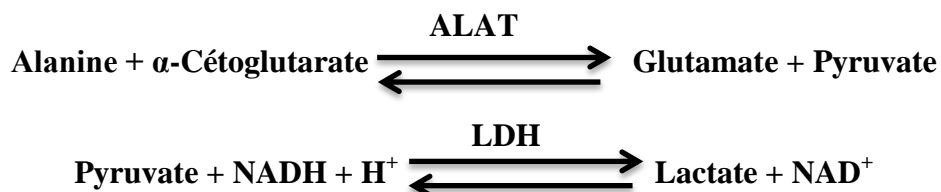
L'aspartate amino-transférase ou glutamo-oxaloacétique transaminase (GOT) catalyse la réaction réversible de transfert d'un groupement amine NH<sub>2</sub> de l'aspartate à l'α-cétoglutarate formant le glutamate et l'oxaloacétate. Ce dernier est réduit en malate par la malate déshydrogénase (MDH) et NADH:



La diminution de la concentration de NADH mesuré à 340 nm par minute est proportionnelle à l'activité catalytique d'ASAT présente dans l'échantillon (Young, 1995).

**4.3. Dosage de l'alanine amino-transférase (ALAT) (Kit SPINREACT, Spain)**

L'alanine amino-transférase ou glutamo-pyruvique transaminase (GPT). Enzyme catalysant la réaction de transamination par transfert réversible d'un groupement amine d'un acide aminé (α-alanine), sur un céto-acide, l'α-cétoglutarate produisant l'acide glutamique et l'acide pyruvique. Le pyruvate produit est réduit en lactate par la lactate déshydrogénase (LDH) et NADH:



La diminution de la concentration de NADH mesuré à 340 nm par minute est proportionnelle à l'activité catalytique d'ALAT présente dans l'échantillon (Young, 1995).

**4.4. Dosage de lactate déshydrogénase (Kit SPINREACT, Spain)**

La lactate déshydrogénase catalyse la réduction du pyruvate par le NADH, selon la réaction ci-dessous:



La diminution de la concentration de NADH mesuré à 340 nm par minute est proportionnelle à l'activité catalytique de LDH présente dans l'échantillon (Young, 1995).

**4.5. Dosage de la phosphatase alcaline (PAL) (Kit SPINREACT, Spain)**

En milieu alcalin (pH 10.4), les phosphatases alcalines catalysent l'hydrolyse du p-nitrophénylphosphate en p-nitrophénol et phosphate. La vitesse d'apparition du p-nitrophénol, suivie par la variation de l'absorbance à 405 nm, est proportionnelle à l'activité PAL dans l'échantillon (Young, 1995).



**4.6. Dosage de la bilirubine directe (Kit SPINREACT, Spain)**

L'acide sulfanilique réagit avec le nitrite de sodium pour donner de l'acide sulfanilique diazoté. En présence de diméthyl sulfoxyde (DMSO), la bilirubine totale se couple l'acide sulfanilique diazoté pour donner l'azobilirubine. Le dosage de la bilirubine directe se fait en l'absence de DMSO pour former l'azobilirubine colorée.

L'intensité de la coloration formée est proportionnelle à la concentration en bilirubine présente dans l'échantillon et mesurée à 555 nm (Burtis et Ashwood, 1999).

**4.7. Dosage des protéines totales (Kit SPINREACT, Spain)**

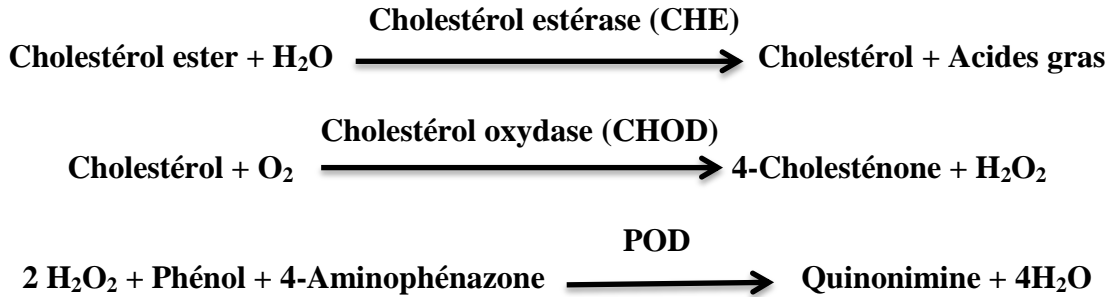
Méthode colorimétrique basée sur la réaction des liaisons peptidiques des protéines avec ions cuivriques Cu<sup>2+</sup> en solution alcaline pour former un complexe coloré (bleu-violet) dont l'absorbance, proportionnelle à la concentration en protéines dans le sérum, est mesurée à 540 (530-550) nm. Le réactif Biuret contient du sodium potassium tartrate qui complexe les ions cuivriques et maintient leur solubilité en solution alcaline ainsi que l'iodure comme un antioxydant (Burtis et Ashwood, 1999).

**4.8. Dosage de l'albumine (Kit SPINREACT, Spain)**

En milieu tamponné à pH 4.2 le vert de bromocrésol se combine à l'albumine pour former un complexe coloré dont l'absorbance mesurée à 630 nm est proportionnelle à la concentration en albumine dans le sérum (Doumas *et al.*, 1971).

**4.9. Dosage du cholestérol (Kit SPINREACT, Spain)**

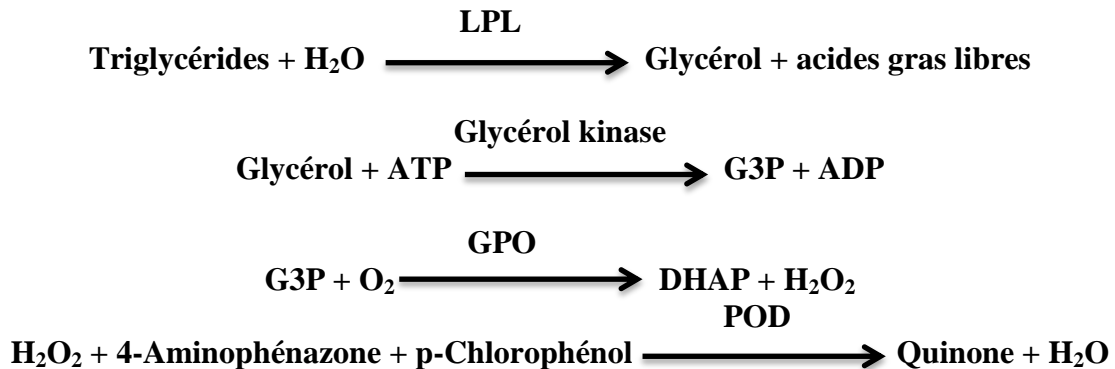
Le cholestérol présent dans l'échantillon forme un complexe coloré selon les réactions ci-dessous :



L'intensité de la couleur formée dont l'absorbance mesurée à 505 (500-550) nm est proportionnelle à la concentration du cholestérol dans l'échantillon (Meiattini *et al.*, 1978).

**4.10. Dosage des triglycérides (Kit SPINREACT, Spain)**

La réaction des triglycérides dans l'échantillon avec la lipoprotéine-lipase (LPL), libère le glycérol et les acides gras libres. Le glycérol est converti en glycérol-3-phosphate (G3P) et ADP par la glycérol kinase et l'ATP. Le G3P est ensuite converti par la glycérol-3-phosphate oxydase (GPO) en dihydroxyacétone phosphate (DHAP) et peroxyde d'hydrogène. Ce dernier se réagit avec le 4-aminophénazone et le p-chlorophénol en présence de POD pour donner une coloration rouge. L'intensité de la coloration formée dont l'absorbance mesurée à 505 nm, est proportionnelle à la concentration en triglycérides dans l'échantillon (Bucolo et David, 1973).



**4.11. Dosage des lipides totaux (Kit SPINREACT, Spain)**

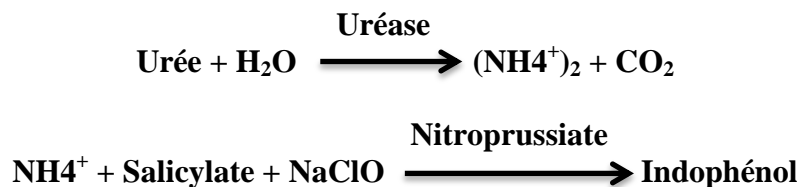
Les acides gras insaturés se réagissent avec l'acide sulfurique pour former les carbocations. Dans une deuxième étape, les carbocations se réagissent avec le phosphovanilline donnant une coloration rose. L'intensité de la coloration formée dont l'absorbance mesurée à 520 nm, est proportionnelle à la concentration en lipides totaux dans l'échantillon (Cottet *et al.*, 1965).

**4.12. Dosage de créatinine (Kit SPINREACT, Spain)**

C'est un dosage colorimétrique cinétique basé sur la réaction de créatinine avec le picrate de sodium décrit par Jaffé. Le principe général de cette méthode consiste à mesurer, à 492 nm, l'intensité de la coloration du complexe rouge-orangé formé par la créatinine et l'acide picrique en milieu alcalin. La quasi-totalité des méthodes reposant sur ce principe effectuent cette mesure non plus en point final mais en cinétique, la vitesse de formation de la coloration étant proportionnelle à la concentration en créatinine dans l'échantillon (Young, 1995).

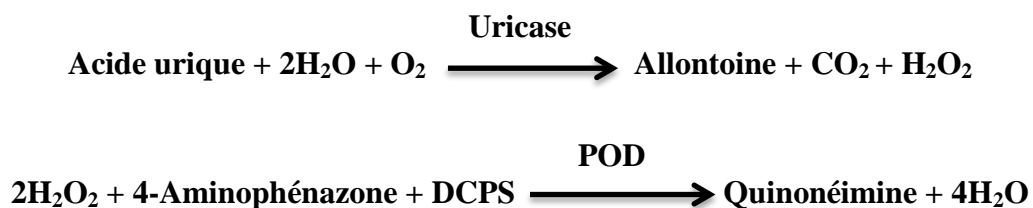
**4.13. Dosage de l'urée (Kit SPINREACT, Spain)**

Méthode enzymatique et colorimétrique basée sur l'action spécifique de l'uréase qui hydrolyse l'urée en ions ammonium et carbonate. Les ions ammonium forment ensuite avec le chlore et le salicylate un complexe coloré bleu-vert. L'intensité de coloration, proportionnelle à la concentration en urée dans l'échantillon, est mesurée à 580 nm (Young, 1995).



**4.14. Dosage de l'acide urique (Kit SPINREACT, Spain)**

L'uricase agit sur l'acide urique pour produire de l'allantoïne, du dioxyde de carbone et du peroxyde d'hydrogène. En présence de peroxydase, de 4-aminophénazone, et de 2-4 dichlorophénol-sulfonate (DCPS), forme un composé rouge de quinoneimine, complexe de couleur rouge. L'absorbance mesurée à 520 nm, est proportionnelle à la concentration d'acide urique dans l'échantillon (Young, 1995).



**4.15. Dosage de la lipase (KIT RANDOX)**

Méthode enzymatique basée sur l'action de la lipase sur le 1,2-diglycéride pour former du 2-monoglycéride hydrolysé en glycérol et acides gras libres par la monoglycéridelipase. La glycérol kinase transforme le glycérol en glycérol-3-phosphate qui génère ensuite du peroxyde d'hydrogène sous l'action de la glycerol-3-phosphate oxydase. Sous l'action de la peroxydase, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 4-Aminoantipyrine et TOOS (N-ethyl-N-(2-hydroxy-3-sulfopropyl)-m-toluidine) participent à la formation d'un complexe coloré quinoneimique. La vitesse de formation de ce complexe, directement proportionnelle à l'activité de la lipase dans le sérum, est mesurée à 550 nm (Young, 1995).

**4.16. Dosage d'α-Amylase (AMS) (Kit SPINREACT, Spain)**

C'est une méthode cinétique basée sur la réaction durant laquelle l'α-amylase catalyse l'hydrolyse de 2-chloro-4-nitrophényl-α-D-maltotrioside (CNPG3) pour libérer le 2-chloro-4-nitrophénol (CNP) et former le 2-chloro-4-nitrophényl-α-D-maltoside (CNPG2), le maltotriose et le glucose selon la réaction suivante:



La vitesse de formation du CNP, directement proportionnelle à l'activité de l'α-amylase dans le sérum, est mesurée à 405 nm (Ying Foo *et al.*, 1998).

**4.17. Dosage de calcium (Kit SPINREACT, Spain)**

C'est un dosage colorimétrique basé sur la formation d'un complexe coloré après réaction entre le calcium et l'o-crésolphtaléine dans un milieu alcalin:



L'intensité de la coloration formée est directement proportionnelle à la concentration de calcium dans l'échantillon (Connerty *et al.*, 1996).

**4.18. Dosage de phosphore (Kit SPINREACT, Spain)**

Une méthode colorimétrique basée sur la formation d'un complexe phosphomolybdique suite à une réaction entre le phosphore et l'acide molybdique, la réduction de complexe formé dans un milieu alcalin donne un molybdenum d'une coloration bleu. L'intensité de la coloration formée est directement proportionnelle à la concentration de phosphore dans l'échantillon (Daly et Ertingshausen, 1972).

**5. Méthodes de détermination quantitative des marqueurs biologiques de stress oxydant**

**5.1. Dosage des protéines tissulaires (Bradford, 1976)**

**5.1.1. Principe**

La méthode de Bradford est une méthode colorimétrique très fréquemment utilisée dans le dosage des protéines. Le principe est basé sur un réactif nommé le bleu brillant de Coomassie G 250 (BBC). Ce pigment existe sous forme cationique, neutre et anionique. Sa longueur d'onde d'absorbance maximale est 465 nm. Sa complexification avec les protéines entraîne une formation d'une coloration bleue avec une modification de sa structure, ainsi qu'un déplacement de sa longueur d'onde de 465 à 595 nm.

L'interaction pigment - protéine s'effectue essentiellement avec:

- ✓ les résidus d'acides aminés hydrophobes;
- ✓ des résidus d'acides aminés basiques (arginine, lysine et histidine);
- ✓ les forces de Van der Waals contribuent aussi à la formation du complexe.

Le développement de cette couleur bleue est proportionnel à la concentration en protéine que dans une gamme de quantité limitée. Au-delà, il n'y a plus proportionnalité d'où l'importance d'établir une gamme étalon précise en utilisant l'albumine sérique bovin ou BSA (Bovin Serum Albumin).

**5.1.2. Mode opératoire**

	<b>Homogénat</b>	<b>Blanc</b>
Homogénat (µl)	100	0 (100 µl TBS)
Réactif de Bradford ou BBC (ml)	5.00	5.00

- ✓ Agiter, incuber pendant 5 min à température ambiante et à l'abri de la lumière.
- ✓ Lire l'absorbance à 595 nm contre le blanc.
- ✓ Etablir une série de tubes de dilutions différentes et de concentrations connues à partir d'une solution mère de BSA (1 mg/ml).
- ✓ Tracer une courbe d'étalonnage ( $DO = f [C]$ ).
- ✓ Calculer la concentration en protéines d'après l'équation obtenue à partir de la courbe d'étalonnage.

**5.2. Dosage de GSH tissulaire (Ellman, 1959)**

**5.2.1. Principe**

Cette méthode de dosage consiste au développement d'une coloration jaune dès l'ajout de DTNB (acide 5,5' dithiodis-2-nitrobenzoïque) aux composés contenant des groupements sulfuriques, parmi ces composés on distingue le glutathion qui se réagit avec le DTNB en libérant l'acide thionitrobenzoïque (TNB) selon la réaction ci-dessous:

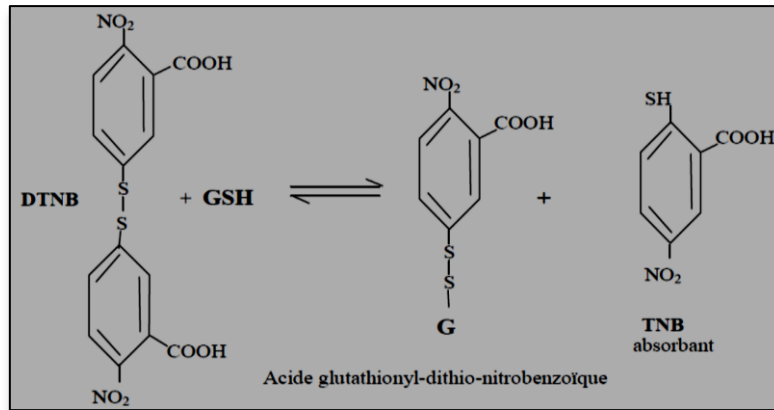


Figure 17. Principe de la méthode d’Ellman

**5.2.2. Mode opératoire**

- ✓ Prélever 0.8 ml d’homogénat.
- ✓ Ajouter 0.2 ml d’acide sulfosalicylique (0.25%).
- ✓ Laisser pendant 15 min dans un bain de glace.
- ✓ Centrifuger les tubes à 2500 g pendant 15min.
- ✓ Mélanger 0.5 ml de surnagent obtenu avec 1ml de TBS (pH 7.4).
- ✓ Ajouter 0.025 ml de DTNB (0.01 M).
- ✓ Incuber 5 min à température ambiante.
- ✓ Lire l’absorbance de l’échantillon contre le blanc à 412 nm.

**5.2.3. Calcul de la concentration**

$$\text{GSH (nmoles GSH/mg prot)} = \frac{\text{DO}}{\epsilon \times L \times \chi} \times \text{Fd}$$

DO: densité optique à 412 nm;

$\epsilon$ : Coefficient d’absorbance du groupement –SH à 412 nm = 13.1;

$\chi$ : Concentration en protéines (mg/ml);

L: Longueur du trajet optique =1 cm;

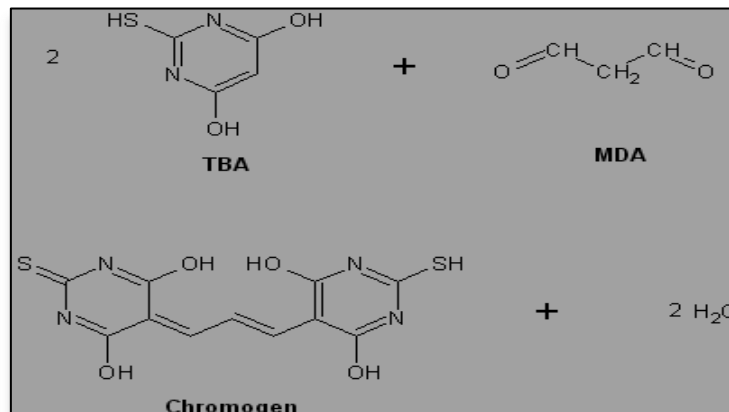
Fd: volume total / volume de l’homogénat = 3.81.

**5.3. Dosage de TBARS (thiobarbituric acid reacting substances) (Esterbauer et Cheeseman, 1990)**

**5.3.1. Principe**

C’est une méthode de dosage qui a pour but d’estimer la peroxydation lipidique par mesure du taux de TBARS dans l’échantillon résultant d’une certaine réactivité avec l’acide thiobarbiturique (TBA) à chaud. 99% de ces substances se présentent sous forme de MDA, l’un des principaux produits de cette peroxydation. L’intensité de la coloration rose obtenue,

est directement proportionnelle au taux de TBARS mesurée à 532 nm et reflétant le degré d'oxydation dans les tissus essentiellement au niveau des membranes cellulaires.



**Figure 18.** Principe de dosage de MDA

### 5.3.2. Mode opératoire

- ✓ Prélever 250 µl d'homogénat.
- ✓ Ajouter 1.5 ml d'acide phosphorique 1% (pH 2.0) et 1 ml de TBA 0.6 %.
- ✓ Agiter.
- ✓ Mettre les tubes dans un bain marie (100 °C) pendant 45 minutes.
- ✓ Laisser refroidir à température ambiante.
- ✓ Ajouter 2.5 ml de butanol pour faire l'extraction du complexe MDA-TBA.
- ✓ Séparer la phase organique en centrifugeant à 2000 g pendant 5 minutes.
- ✓ Lire l'absorbance à 532 nm de l'échantillon contre le blanc.

### 5.3.3. Calcul de concentrations

$$\text{TBARS (nmoles TBARS/mg prot)} = \frac{\text{DO} \times 10^6}{\varepsilon \times L \times \chi} \times \text{Fd}$$

DO: densité optique à 532 nm;

$\varepsilon$ : coefficient d'extinction molaire de MDA  $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ;

$\chi$ : Concentration en protéines (mg/ml);

L: 1 cm;

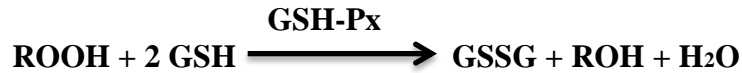
Fd: 21.

## 5.4. Détermination d'activité enzymatique de la GSH-Px (EC 1.11.1.9) (Flohe et Gunzler, 1984)

### 5.4.1. Principe

Le glutathion peroxydase catalyse la réduction de peroxyde d'hydrogène en utilisant le GSH comme un réducteur. Cette méthode est parmi les méthodes les plus couramment

utilisées pour la détermination tissulaire de cette enzyme en mesurant la quantité de GSH oxydé par mg de protéine. Elle repose sur le même principe d'Ellman concernant le développement de la coloration jaune après avoir complexification du glutathion restant dans le milieu avec le DTNB.



**5.4.2. Mode opératoire**

- ✓ Prélever 0.2 ml d'homogénat.
- ✓ Ajouter 0.2 ml de TBS (pH 7.4).
- ✓ Mélanger et ajouter 0.4 ml GSH (0,1mM).
- ✓ Laisser 5 minutes à 25 °C.
- ✓ Initier la réaction par addition de 0.2 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1.3 mM).
- ✓ Laisser réagir pendant 10 min à température ambiante.
- ✓ Stopper la réaction par addition de 1 ml TCA (Trichloroacétic acid) à 1%.
- ✓ Centrifuger les tubes à 1500 g pendant 5 minutes.
- ✓ Prélever 0.48 ml de surnagent.
- ✓ Ajouter 2.2 ml TBS (pH 7.4).
- ✓ Ajouter 0.32 ml DTNB (1.0 mM).
- ✓ Incuber pendant 5 minutes à 25 °C.
- ✓ Lire l'absorbance de l'échantillon à 412 nm.
- ✓ Etablir un tube blanc subit le même protocole et dépourvu de l'homogénat (source d'enzyme).

**5.4.3. Calcul de l'activité enzymatique**

$$\text{GSH-Px } (\mu\text{moles GSH oxydé/mg prot}) = \frac{\text{DO} \times 10^3}{\epsilon \times L \times \chi} \times \text{Fd}$$

DO: (DO blanc – DO échantillon) mesurée à 412 nm;

ε: Coefficient d'absorbance du groupement –SH à 412 nm = 13.1;

χ: Concentration en protéines (mg/ml);

L: 1 cm;

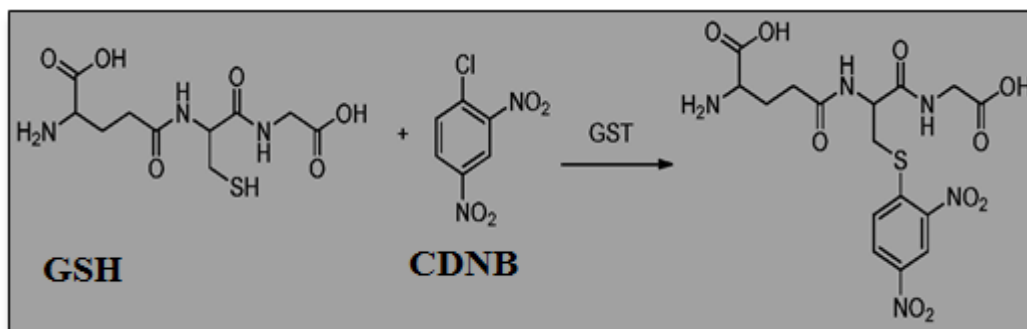
Fd: 62.5.

**5.5. Détermination d'activité enzymatique de la GST (EC 2.5.1.18) (Habig *et al.*, 1973)**

**5.5.1. Principe**

L'activité enzymatique de la glutathion-S-transférase a été mesurée selon la méthode décrite par Habig *et al.* (1973). Cette activité est déterminée via la formation

du 1-gluthation-2,4-dinitrobenzène qui sert de chromophore à la longueur d'onde de 340 nm à partir du 1-chloro-2,4-dinitrobenzène (CDNB) considéré comme un substrat électrophile et du glutathion, le principe est illustré dans la figure ci-dessous:



**Figure 19.** Principe de dosage de GST

**5.5.2. Mode opératoire**

Réactifs	Blanc (µl)	Essai (µl)
Tampon phosphate (0.1 M) pH 6.5	830	830
CDNB (0.02 M)	50	50
GSH (0.1 M)	100	100
Homogénat	0 (20 µl TBS)	20

- ✓ Lire les absorbances de l'échantillon et du blanc à 340 nm toute les minutes pendant 5 minutes.

**5.5.3. Calcul de l'activité enzymatique**

$$\text{GST (UI/mg prot)} = \frac{\Delta\text{DO}}{\varepsilon \times L \times \chi} \times \text{Fd}$$

UI: µmoles complexe CDMB-GSH formé/min;

ΔDO: (ΔDO échantillon/ min – ΔDO blanc/ min) à 340 nm;

ε: coefficient d'extinction molaire du CDMB = 9.6 mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>;

χ: Concentration en protéines (mg/ml);

L: 1 cm;

Fd: 50.

**5.6. Détermination d'activité enzymatique de la GR (EC 1.8.1.7) (Goldberg et Spooner R J, 1983)**

**5.6.1. Principe**

Cette méthode est basée sur la détermination d'activité enzymatique du glutathion réductase en mesurant la quantité du NADPH consommé par minute. La GR catalyse la

réaction de réduction du glutathion oxydé et d'oxydation du NADPH résultant une diminution d'absorbance de ce dernier à 340 nm comme le montre la figure:

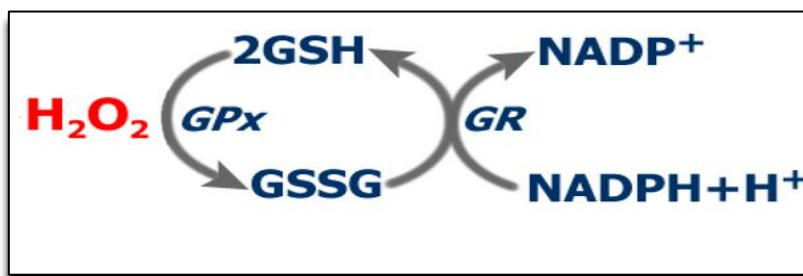


Figure 20. Réaction d'oxydoréduction catalysée par GR

### 5.6.2. Mode opératoire

Réactifs	Blanc (µl)	Essai (µl)
Eau distillée	930	920
Tampon (pH 7.3)	40	40
GSSG (2.2 mM)	20	20
Homogénat	/	10

- ✓ Mélanger.
- ✓ Régler le spectrophotomètre à 340 nm.
- ✓ Mettre la cuve contenant soit le blanc, soit l'essai et ajuster l'absorbance à zéro.

Réactifs	Blanc (µl)	Essai (µl)
NADPH (0.17 mM)	10	10

- ✓ Mélanger.
- ✓ Démarrer le chronomètre et lire les absorbances de l'échantillon et du blanc toute les minutes pendant 5 minutes.

### 5.6.3. Calcul de l'activité enzymatique

$$GR \text{ (UI/mg prot)} = \frac{\Delta DO}{\varepsilon \times L \times \chi} \times Fd$$

UI: µmoles GSSG réduit correspond au µmoles NADPH consommé/min;

ΔDO: (ΔDO échantillon/ min – ΔDO blanc/ min) à 340 nm;

ε: coefficient d'extinction molaire du NADPH = 6.22 mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>;

χ: Concentration en protéines (mg/ml);

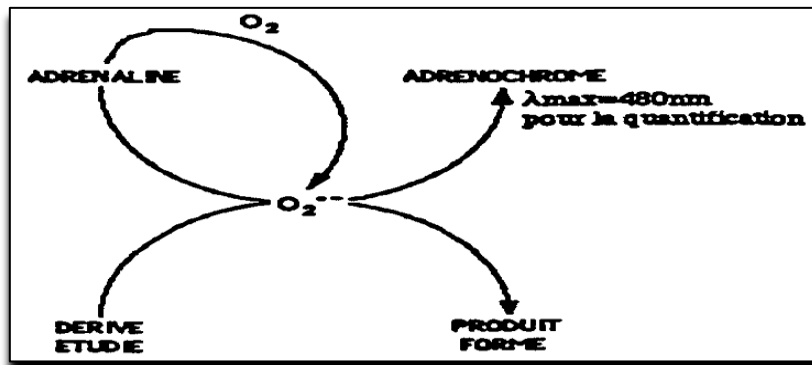
L: 1 cm;

Fd: 100.

**5.7. Détermination d'activité enzymatique de la SOD (EC 1.15.1.1) (Misra et Fridonich (1977))**

**5.7.1. Principe**

La méthode de Misra et Fridonich (1977) permet d'apprécier l'effet antioxydant du superoxyde dismutase par mesure de la quantité d'enzyme capable d'inhiber 50% d'auto-oxydation d'épinéphrine en milieu alcalin à 480 nm. Une augmentation de l'absorbance est proportionnelle à cette auto-oxydation qui se reflète par la formation d'un adrénochrome d'où le développement d'une coloration rose:



**Figure 21.** Oxydation de l'adrénaline en adrénochrome via l'anion superoxyde

**5.7.2. Mode opératoire**

Réactifs	Blanc (µl)	Essai (µl)
Tampon EDTA sodium carbonate 0.05 M (pH 10.2)	970	970
Epinéphrine (30 mM)	20	20
Homogénat	0 (10 µl TBS)	10

- ✓ Mélanger.
- ✓ Démarrer le chronomètre et lire les absorbances de l'échantillon et du blanc toute les minutes pendant 4 minutes à 480 nm.

**5.7.3. Calcul de l'activité enzymatique**

$$\text{SOD (UI/mg prot)} = \frac{\Delta\text{DO}}{\epsilon \times L \times \chi} \times \text{Fd}$$

UI: quantité d'enzyme capable d'inhiber 50% d'auto-oxydation d'épinéphrine/min;

ΔDO: (ΔA échantillon/ min – ΔA blanc/ min) à 480 nm;

ε: coefficient d'extinction molaire d'épinéphrine = 4.2 mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>;

χ: Concentration en protéines (mg/ml);

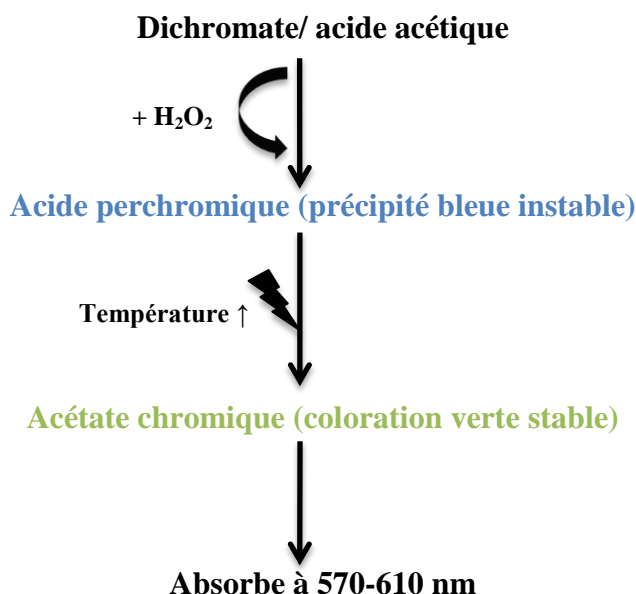
L: 1 cm;

Fd: 100.

**5.8. Détermination de l'activité enzymatique CAT (EC 1.11.1.6) (Sinha, 1972)**

**5.8.1. Principe**

La catalase catalyse la réaction de décomposition d'eau oxygénée en H<sub>2</sub>O et O<sub>2</sub>. La détermination de son activité par Sinha (1972) est basée sur la réduction du dichromate (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>) en milieu acide en acétate chromique en présence d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et à température élevée, avec la formation d'un intermédiaire instable: l'acide perchromique. L'intensité de la coloration due à la production d'acétate chromique mesuré à 570-610 nm est proportionnelle à la quantité d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> restante dans le milieu et n'a pas subi une décomposition par l'enzyme. L'activité enzymatique est calculée à l'aide d'une courbe d'étalonnage DO = f (μmoles d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).



**5.8.2. Mode opératoire**

Réactifs	Blanc (ml)	Essai (ml)
Tampon phosphate 0.01 M (pH 7.0)	0.5	0.5
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (0.2 M)	0.4	0.4
Homogénat	0 (0.1 ml TBS)	0.1

- ✓ Mélanger.
- ✓ Incuber 1 minute à température ambiante.
- ✓ Stopper la réaction par l'ajout de 2 ml du dichromate/acide acétique (1:3 V/V).
- ✓ Mettre 10 minutes dans un bain marie à ébullition.
- ✓ Laisser refroidir à 25 °C.
- ✓ Lire les absorbances du blanc et de l'échantillon à 590 nm (570-610).

- ✓ Dans les mêmes conditions, établir une série de tubes contenant des quantités accrues d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à partir d'une solution mère 0.2 M.
- ✓ Tracer une courbe d'étalonnage  $DO_{590\text{ nm}} = f(\mu\text{moles d'H}_2\text{O}_2)$ .

### 5.8.3. Calcul de l'activité enzymatique

$$\text{CAT (UI/mg prot)} = \frac{(\text{S blanc} - \text{S échantillon})}{\chi} \times \text{Fd}$$

UI:  $\mu\text{moles H}_2\text{O}_2$  décomposé/min;

S blanc:  $\mu\text{moles H}_2\text{O}_2$  n'a pas subi une décomposition spontanée et resté dans le milieu réactionnel entraînant ainsi la formation d'acétate chromique, la valeur est retirée d'après l'équation de la courbe d'étalonnage;

S échantillon:  $\mu\text{moles H}_2\text{O}_2$  n'a pas subi une décomposition catalysée par l'enzyme et resté dans le milieu réactionnel entraînant ainsi la formation d'acétate chromique, la valeur est retirée d'après l'équation de la courbe d'étalonnage;

$\chi$ : Concentration en protéines (mg/ml);

Fd: 30.

## 5.9. Dosage de la vitamine E (Desai, 1984)

### 5.9.1. Principe

La concentration tissulaire en vitamine E est estimée par la méthode de Desai (1984). Celle-ci est basée sur l'extraction de la vitamine E présente dans l'homogénat en utilisant les solvants organique, après séparation par centrifugation et évaporation, le précipité obtenu est réagi avec le chlorure de fer, ce dernier se complexe avec un indicateur chimique qui est le bathophénanthroline en donnant une coloration rouge dont l'intensité est proportionnelle à la concentration tissulaire en vitamine E mesurée à 530 nm.

### 5.9.2. Mode opératoire

- ✓ Prélever 1 ml d'homogénat.
- ✓ Ajouter 1 ml d'éthanol.
- ✓ Agiter.
- ✓ Ajouter 3 ml d'éther de pétrole.
- ✓ Mélanger rapidement et centrifuger à 4000 tours/ min pendant 10 minutes.
- ✓ Prélever 2 ml de surnagent obtenu en évaporant à 80 °C.
- ✓ Ajouter 0.2 ml bathophénanthroline 0.2%, 0.2 ml chlorure de fer (FeCl<sub>3</sub>: 0.001 M) et 0.2 ml d'acide phosphorique (0.001 M).
- ✓ Laisser à l'obscurité pendant 5 minutes.

- ✓ Compléter jusqu'à 3 ml volume total de la réaction avec l'éthanol.
- ✓ Lire l'absorbance à 530 nm.

**5.9.3. Calcul de concentrations**

$$\text{Vitamine E (mg vitamine E/mg prot)} = \frac{\text{DO}}{\varepsilon \times L \times \chi} \times \text{Fd}$$

DO: densité optique à 530 nm;

$\varepsilon$ : coefficient d'extinction molaire de bathophénanthroline =  $22350 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ;

$\chi$ : Concentration en protéines (mg/ml);

L: 1 cm;

Fd: 14.

## **6. Technique histologique**

Les coupes histologiques ont été réalisées à CHU Ibn Roched d'Annaba, service d'anatomie pathologique, suivant la technique décrite par (Houlot, 1984). La technique comporte les étapes suivantes :

### **6.1. Fixation des échantillons**

Elle a pour but d'immobiliser les structures cellulaires tout en conservant leurs morphologies. Le temps de fixation est essentiel pour la réussite de cette technique. Des fragments de foie, rein, cerveau et testicule ont été alors mis dans le formol 10% qui constitue un fixateur classique très utilisé. Il permet de durcir l'échantillon sans l'abîmer. Après 48 heures de fixation les pièces d'organes sont retirées du formol puis coupés à l'aide de couteaux tranchants avec une surface de 1 à 2 cm<sup>2</sup> et une épaisseur proche de 1.5 mm. Les échantillons sont placés dans des cassettes spéciales permettant le passage des liquides au cours des manipulations qui suivent.

### **6.2. Déshydratation**

Les échantillons doivent être complètement déshydratés avant d'être inclus dans la paraffine. Cette dernière n'est pas soluble dans l'alcool utilisé pour la déshydratation, on assiste donc à une substitution par un solvant (xylène). La déshydratation se fait grâce à un automate qui fait immerger les échantillons dans des bains d'éthanol à concentrations croissantes (70 %, 95 % et 100 %), puis dans des bains de xylène qui constitue un agent éclaircissant donnant au tissu une certaine transparence. Ce solvant est évaporé ensuite grâce à une étuve. Cette étape est réalisée par un appareil appelé le circulateur.

### **6.3. Inclusion et construction des blocs**

Les pièces sont incluses dans un bain de paraffine fondue pendant deux heures. La paraffine va pénétrer dans les tissus en remplaçant le solvant. Après saturation par la paraffine fondue, on passe à l'inclusion définitive dans de petits moules à fond plat qui servent à donner la forme du bloc. Ce dernier peut se conserver pendant des années sans avoir des altérations. Cette opération fait appel à des appareils «dits à inclusion» renfermant un réservoir de paraffine maintenue à l'état liquide par un système de chauffage, un petit robinet et une plaque métallique réfrigérée pour obtenir la solidification rapide du bloc de paraffine contenant le tissu.

### **6.4. Confection des coupes histologiques**

Les blocs de paraffine sont préalablement taillés avant de subir des coupes au microtome de 4 à 5 µm. Les rubans de paraffine obtenus sont étalés sur des lames porte-objet, puis dépliés et fixés par une eau gélatineuse chauffée à 40 °C. Les lames sont ensuite

séchées dans une étuve à 100 °C pendant 1 heure.

### 6.5. Coloration

La coloration nécessite l'utilisation de la technique à l'hématoxyline-éosine ou hémateïne-éosine; qui exige la présence d'un alcool acide (100 ml d'alcool éthylique à 70 % + 50 ml d'HCl), eau ammoniacale (100 ml d'eau distillée + 2 ml ammoniaque) et solution d'éosine (100 ml éosine solution aqueuse à 3 %, 125 ml alcool éthylique à 95 %, 375 ml d'eau distillée et 2 gouttes d'acide acétique). La coloration suit 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 violacé 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'éosine (15 secondes à 2 minutes) qui colore en rose les structures acidophiles (cytoplasme). Tous ces bains sont séparés par des lavages à l'eau du robinet.

Les préparations ont ensuite été séchées puis observées à différents grossissements au microscope optique équipé d'un appareil photo.

### 7. Étude statistique

Les résultats ont été représentés sous forme de moyennes avec leur écart-type (Moy ± SEM). Les analyses statistiques ont été effectuées pour une probabilité définie selon le test de la variable « t » de Student basant sur la comparaison des moyennes deux à deux.

- ✓ différence significative entre lots traités et lot témoin:
  - \* une différence significative  $p \leq 0.05$ ;
  - \*\* une différence hautement significative  $p \leq 0.01$ ;
  - \*\*\* une différence très hautement significative  $p \leq 0.001$ .
- ✓ différence significative par rapport au lot traité  $\text{AgNO}_3$ :
  - # une différence significative  $p \leq 0.05$ ;
  - ## une différence hautement significative  $p \leq 0.01$ ;
  - ### une différence très hautement significative  $p \leq 0.001$ .
- ✓ différence significative comparant les 2 lots ( $\text{AgNO}_3$  + vitamine E et  $\text{AgNO}_3$  + Se) avec le lot  $\text{AgNO}_3$  + vitamine E + Se:
  - + une différence significative  $p \leq 0.05$ ;
  - ++ une différence hautement significative  $p \leq 0.01$ ;
  - +++ une différence très hautement significative  $p \leq 0.001$ .

# ***RÉSULTATS ET DISCUSSION***

**1. Évaluation de la variation du poids corporel, poids des organes et consommation journalière en eau et en aliment**

**1.1. Résultats**

**1.1.1. Effet sur le poids corporel**

Durant les 3 mois du traitement par l'argent à une dose de 20 mg/L d'eau de boisson, aucune renseignement n'a été enregistrée concernant la mortalité sous son effet ou l'apparence de certains signes cliniques tels que: perte de poids, diarrhée, vomissement, hypoactivité (manque de vivacité), crises convulsives ou agitation ainsi que la maladie dermatologique (argyrie) et/ou oculaire (argyrose) liée à l'exposition à ce métal.

Le suivi de la variation de la masse corporelle des animaux n'a signalé donc aucune différence significative entre lot témoin et l'autre traité en les pesant d'une façon régulière chaque semaine pendant les 12 semaines et en évaluant finalement le gain total du poids.

Cependant, la mesure du poids corporel final a montré une augmentation significative ( $p \leq 0.05$ ) chez le lot  $AgNO_3 + Se$  comparé au lot  $AgNO_3 + Vit E + Se$ . Mais le gain du poids corporel n'a présenté aucun changement entre les différents lots. Les valeurs obtenues sont résumées dans le tableau 10.

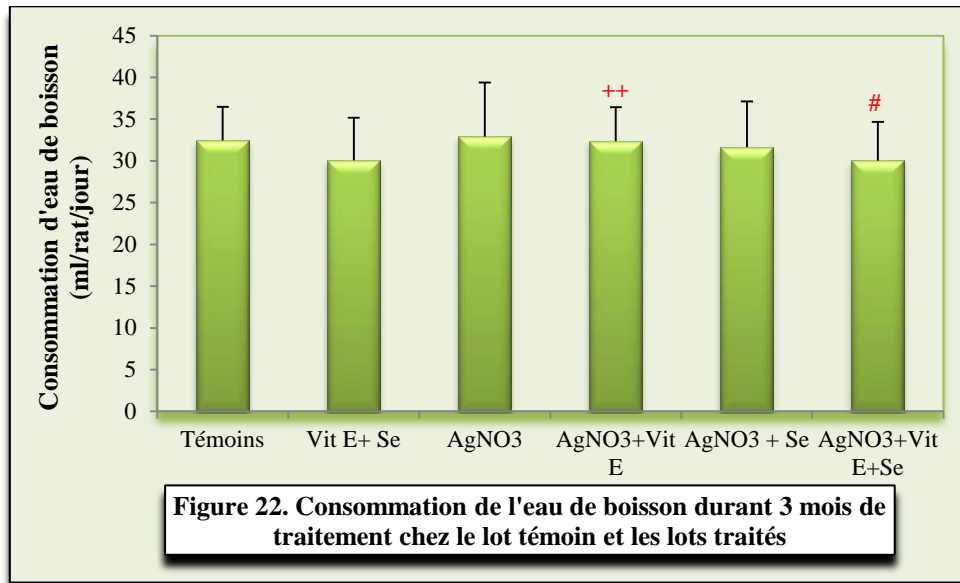
**Tableau 10.** Changement du poids corporel (g) au cours de l'expérience

Paramètres	Lots expérimentaux					
	Témoins	Vit E + Se	$AgNO_3$	$AgNO_3 + Vit E$	$AgNO_3 + Se$	$AgNO_3 + Vit E + Se$
<b>Poids initial</b>	285.71 ±13.3	283.71±29.6	278.71 ± 28.5	287.86 ±51.12	276.28 ±32.85	266±36.11
<b>Poids final</b>	374.28 ±32.7	364.4 ± 38.1	375.86 ± 0.28	363.57 ±39.36	373.43±32.85 <sup>+</sup>	332.71±17.0
<b>Gain du poids corporel</b>	88.57 ± 32.6	80.71 ± 20.3	97.14 ± 57.21	75.72 ± 51.12	97.14 ± 18.42	66.71±47.97

<sup>+</sup>( $p \leq 0.05$ ): différence significative entre  $AgNO_3 + Se$  et  $AgNO_3 + Vit E + Se$

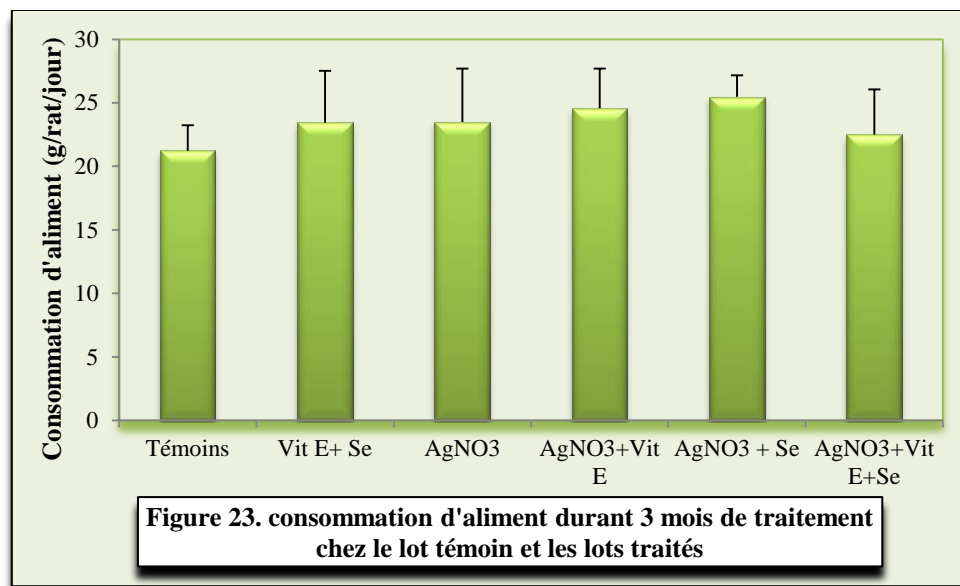
**1.1.2. Effet sur la consommation journalière en eau et en aliment**

La toxicité chronique du métal n'a induit aucune perturbation comparée au lot témoin en intéressant à la consommation quotidienne d'eau de boisson et de nourriture. Alors qu'un abaissement significatif ( $p \leq 0.05$ ) de la consommation d'eau a été trouvé chez le groupe supplémenté par la vitamine E et le sélénium par rapport au groupe traité seulement par Ag. Tandis que la consommation de la nourriture n'a pas été changée d'une façon significative comparant les autres groupes les uns aux autres tout au long de l'expérience. Les deux figures ci-dessous illustrent les principales variations.



# ( $p \leq 0.05$ ): différence significative entre AgNO<sub>3</sub> et AgNO<sub>3</sub> + Vit E + Se;

++ ( $p \leq 0.01$ ): différence hautement significative entre AgNO<sub>3</sub> + Vit E et AgNO<sub>3</sub> + Vit E + Se



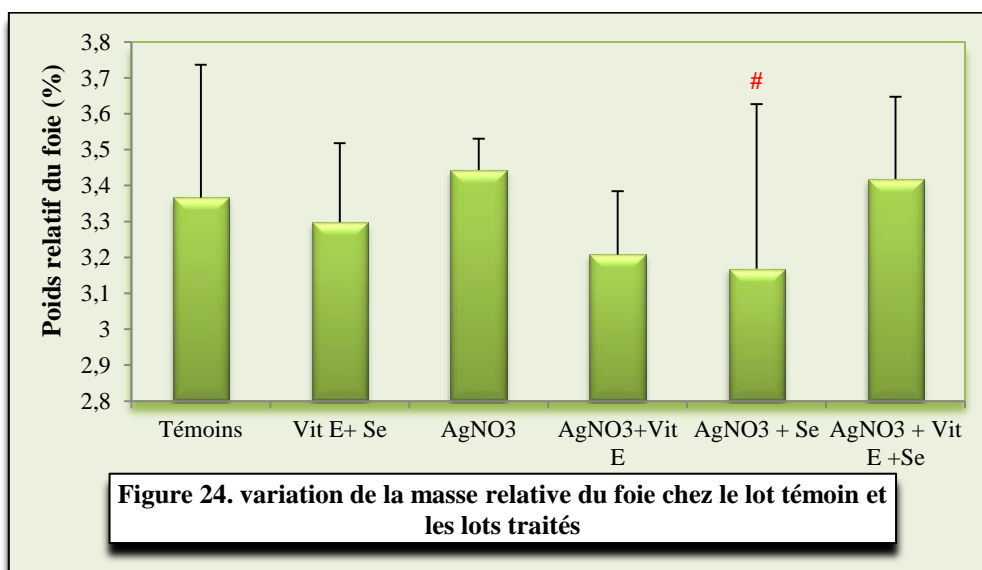
### 1.1.3. Effet sur le poids absolu (PA) et le poids relatif (PR) des organes prélevés

De même que les autres paramètres, l'examen des organes n'a révélé que quelques changements significatifs, précisément on assiste à une diminution significative ( $p \leq 0.05$ ) du poids absolu et relatif du foie du groupe AgNO<sub>3</sub> + Se en comparant avec le groupe AgNO<sub>3</sub>. Les changements obtenus sont détaillés dans le tableau 11 et les figures 24, 25, 26 et 27.

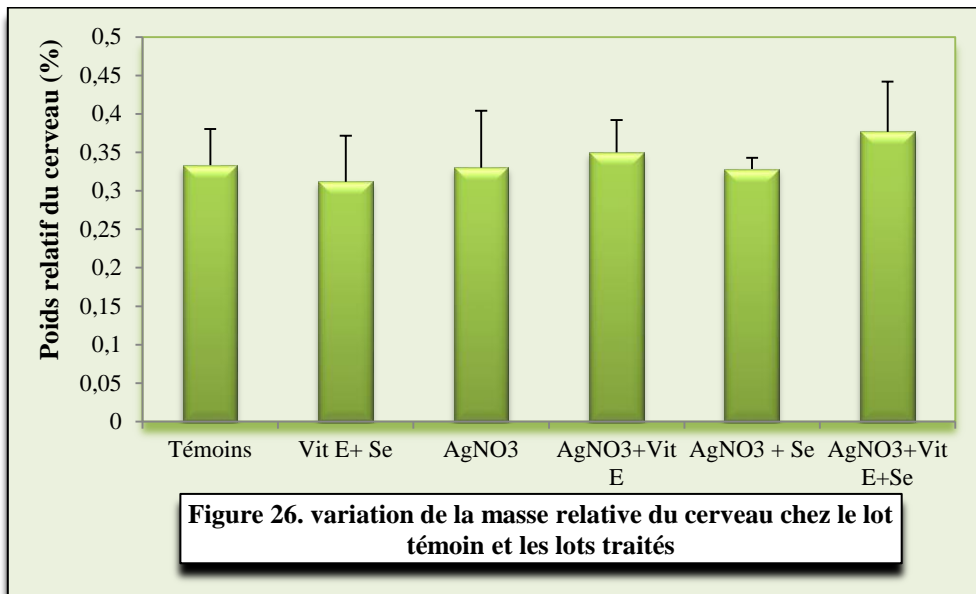
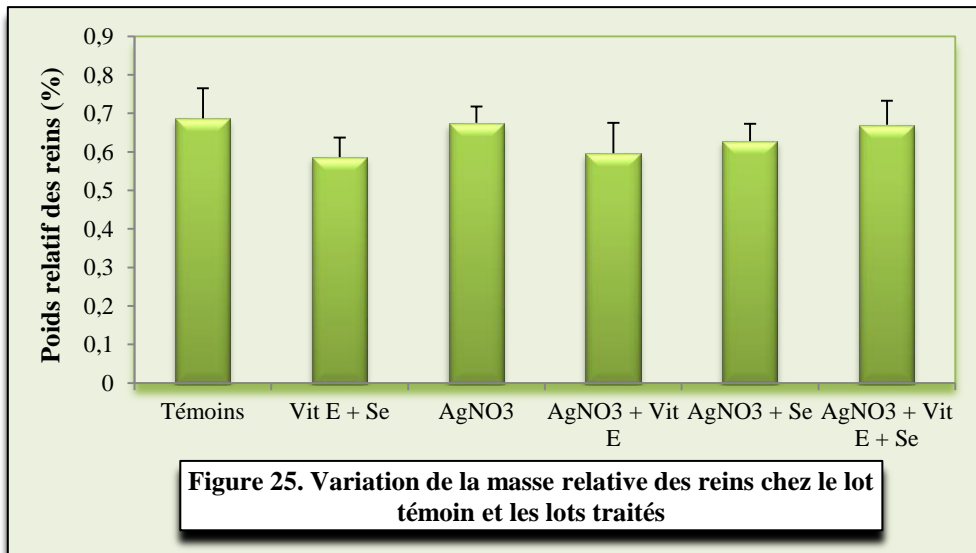
**Tableau 11.** Variation du poids absolu (g) du foie, reins, cerveau et testicules au cours de l'expérience

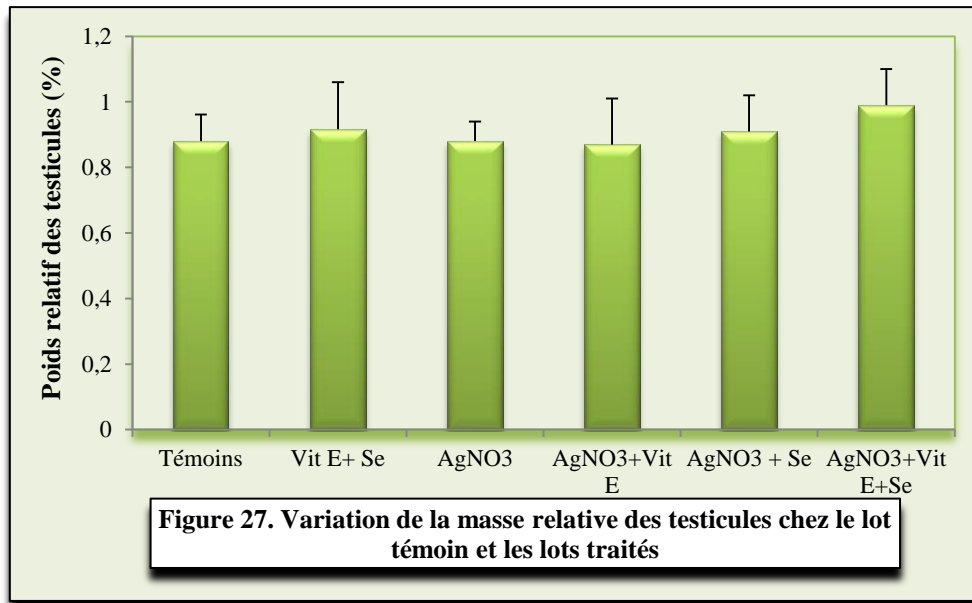
Paramètres	Lots expérimentaux					
	Témoins	Vit E + Se	AgNO <sub>3</sub>	AgNO <sub>3</sub> + Vit E	AgNO <sub>3</sub> + Se	AgNO <sub>3</sub> + Vit E + Se
PA (Foie)	12.7 ± 2.04	12.1 ± 1.42	13.25 ± 1.41	11.82 ± 1.62	11.85 ± 0.75 <sup>#</sup>	12.13 ± 1.53
PA (Reins)	2.6 ± 0.43	2.15 ± 0.26	2.6 ± 0.29	2.2 ± 0.38	2.35 ± 0.10	2.39 ± 0.23
PA (Cerveau)	1.27 ± 0.21	0.31 ± 0.06	1.25 ± 0.16	1.28 ± 0.1	1.23 ± 0.08	1.3 ± 0.24
PA (Testicules)	3.22 ± 0.28	3.33 ± 0.38	3.38 ± 0.33	3.17 ± 0.44	3.42 ± 0.4	3.32 ± 0.20

<sup>#</sup>(p ≤ 0.05): différence significative entre AgNO<sub>3</sub> et AgNO<sub>3</sub> + Se



<sup>#</sup>(p ≤ 0.05): différence significative entre AgNO<sub>3</sub> et AgNO<sub>3</sub> + Se





## 1.2. Discussion

L'argent est un métal ubiquitaire dont la distribution géochimique est influencée par les conditions atmosphériques et environnementales, l'activité biologique et l'activité humaine.

Il se présente fréquemment dans les sols, les cours d'eau, l'eau de mer, les fruits de mer, les poissons et les produits de l'agriculture à des quantités très infimes, ce qui minimise un risque d'une certaine toxicité pourra être induite par ce métal. Néanmoins, un grand risque se pose grâce aux mines et/ou industries à base d'argent. Certes, quelles que soient les conditions d'exposition, le degré de toxicité dépend de type d'exposition (contact dermatologique, inhalation ou ingestion), de la nature d'argent métallique (surtout concernant les formes des nanoparticules), des alliages, de types de composés d'argent, de concentration des ions  $\text{Ag}^+$  biologiquement actives libérées et bien sûr la durée de contact (Lansdown, 2010<sup>b</sup>).

Des études occupationnelles, environnementales et cliniques ont été mises dans le cadre d'estimer les effets d'argent sur la santé (Landas *et al.*, 1985; Wan *et al.*, 1991). Mais, ces études devront être complétées par des études expérimentales *in vivo* et *in vitro* pour pouvoir varier les doses et la durée (Peterson *et al.*, 1973; Rungby et Danscher, 1984; Baldi *et al.*, 1988). Ces travaux sont pris en compte par des organisations mondiales afin de limiter l'exposition aléatoire des travailleurs et l'usage inconscient des instruments médicaux ou cosmétiques à base d'argent (EPA, 1980; WHO, 1996), tandis que la pollution induite par les industries entraînant la contamination des eaux de boisson et de la nourriture consommés ensuite par l'homme constitue toujours un risque accru d'exposition.

Notre travail vise donc à évaluer la toxicité chronique d'argent par voie orale et précisément dans l'eau de boisson à faible dose (20 mg/L) vis-à-vis à la vitamine E et le sélénium, deux

substances ayant des rôles physiologiques cruciaux au niveau cellulaire en cherchant donc le mécanisme de toxicité par Ag *in vivo*.

Dans ce sens, nous avons premièrement accédé à la variation de poids corporel, poids des organes ainsi que la consommation d'eau et de nourriture durant les 90 jours, ces critères constituent un examen classique souvent évoqué dans la toxicologie. Une perte de poids et/ou un manque d'appétit pourront être la répercussion de troubles hormonaux, de malabsorption de différents nutriments et/ou de catabolisme excessive des protéines et des lipides (Erdogan *et al.*, 2005). Toutefois, cet examen ne reflète pas toujours des changements pathologiques au sein de l'organisme, nos résultats montrent que l'argent n'affecte pas les paramètres mentionnés précédemment ce qui est en corrélation avec d'autres investigations chez le rat en citant l'étude de Kim *et al.* (2008), Park *et al.* (2010) et Van Der Zande *et al.* (2012). Chez l'homme, Munger *et al.* (2014) ont aussi constaté que l'exposition à l'argent ne conduit pas à une perte de poids chez 60 volontaires.

Mais, un retard de développement et un abaissement de gain de poids corporel ont été suggérés par d'autres études chez des rats traités oralement à l'argent (Matuk *et al.*, 1981; Kim *et al.*, 2010).

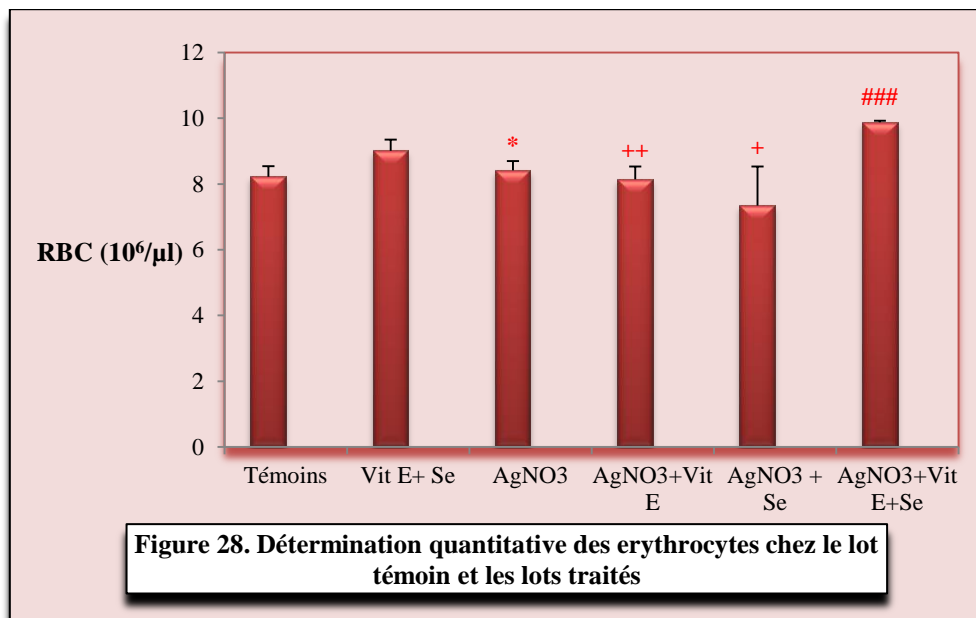
La supplémentation en vitamine E et/ou en sélénium a entraîné quelques modifications comme la réduction de la consommation d'eau et du poids de foie par rapport aux rats traités par Ag, ce qui pourra être expliquée aux effets adverses de ces deux antioxydants contre le métal, mais cela nécessite l'analyse d'autres examens dont les résultats seront détaillés prochainement.

**2. Évaluation de l'examen hématologique**

**2.1. Résultats**

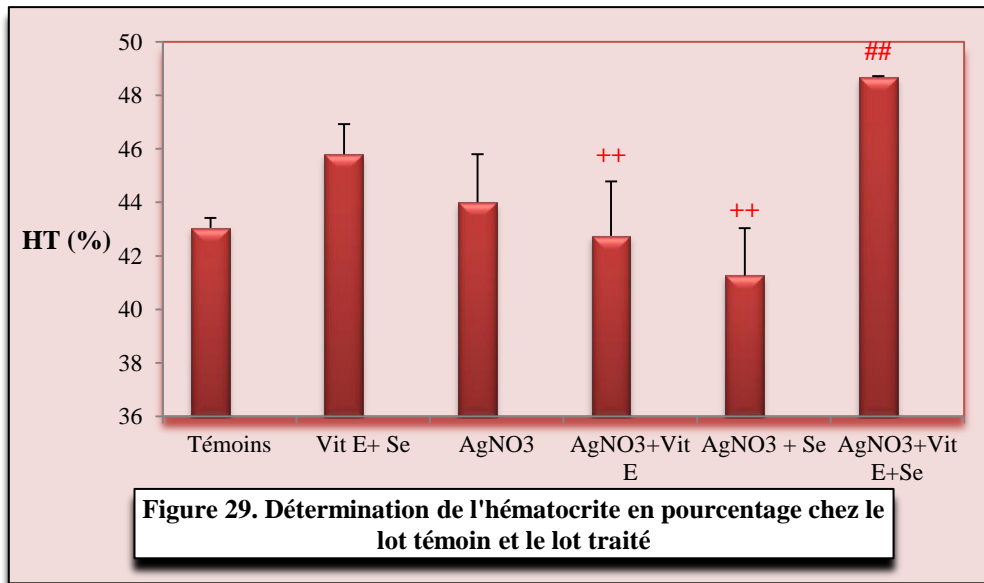
**2.1.1. Variations érythrocytaires**

On constate à une élévation significative ( $p \leq 0.05$ ) du nombre des érythrocytes (RBC: red blood cells), mais une augmentation non significative d'hématocrite (HT) et d'hémoglobine (HB) chez le lot  $AgNO_3$  comparant aux témoins. De sa part, le lot  $AgNO_3 + Vit E + Se$  a enregistré une augmentation très hautement significative ( $p \leq 0.001$ ) de nombre des hématies ainsi qu'une augmentation hautement significative ( $p \leq 0.01$ ) d'hématocrite et d'hémoglobine lors de comparaison avec le lot  $AgNO_3$  (figures 29, 30, 31). Alors que ces paramètres ont signalé une diminution hautement significative ( $p \leq 0.01$ ) et une diminution (significative:  $p \leq 0.05$ , hautement significative:  $p \leq 0.01$  et très hautement significative:  $p \leq 0.001$ ) chez les lots  $AgNO_3 + Vit E$  et  $AgNO_3 + Se$  respectivement par rapport au lot  $AgNO_3 + Vit E + Se$ . De plus, cette supplémentation a fait abaisser la CCMH (concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine) ( $p \leq 0.05$ ), le VMC (volume moyen corpusculaire) ( $p \leq 0.001$ ) et la TCMH (teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine) ( $p \leq 0.01$ ) par rapport aux rats traités seulement par l'argent. Nos résultats ont aussi montré une élévation hautement significative ( $p \leq 0.01$ ) et très hautement significative ( $p \leq 0.001$ ) des paramètres CCMH et VMC, TCMH respectivement chez les rats dont l'aliment est supplémente par la vitamine E et ceux avec supplémentation en vitamine E et sélénium (tableau 12).

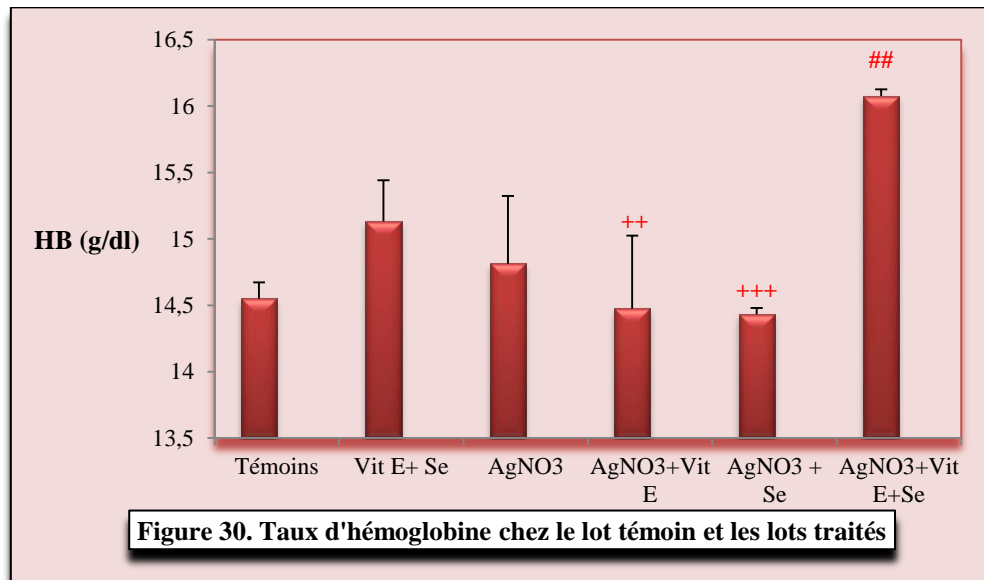


**Figure 28. Détermination quantitative des erythrocytes chez le lot témoin et les lots traités**

\* ( $p \leq 0.05$ ): différence significative entre  $AgNO_3$  et témoins;  
 ### ( $p \leq 0.001$ ): différence très hautement significative entre  $AgNO_3$  et  $AgNO_3 + Vit E + Se$ ;  
 + ( $p \leq 0.05$ ): différence significative entre  $AgNO_3 + Se$  et  $AgNO_3 + Vit E + Se$   
 \*\* ( $p \leq 0.01$ ): différence hautement significative entre  $AgNO_3 + Vit E$  et  $AgNO_3 + Vit E + Se$



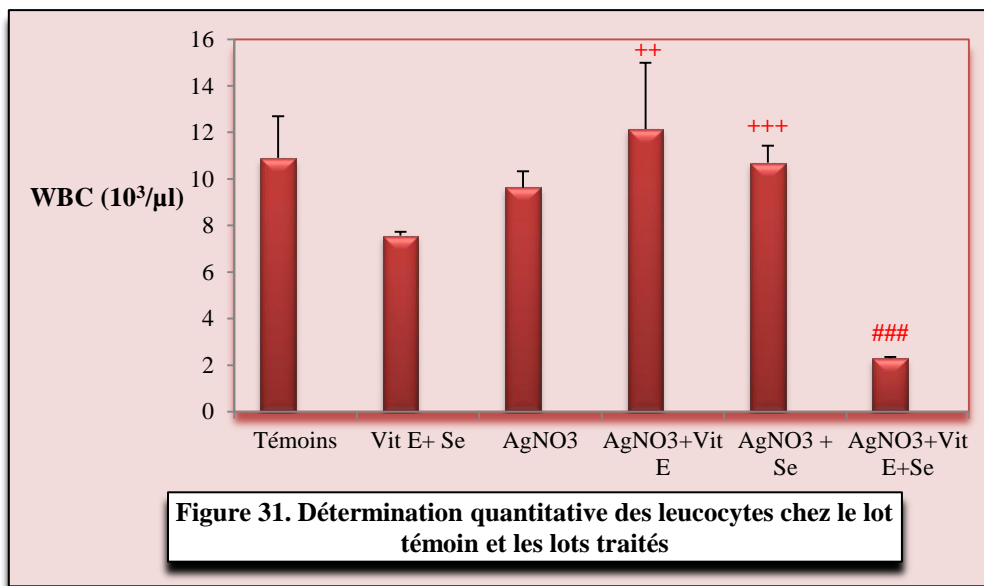
## ( $p \leq 0.01$ ): différence hautement significative entre AgNO<sub>3</sub> et AgNO<sub>3</sub> + Vit E + Se;  
 ++ ( $p \leq 0.01$ ): différence hautement significative entre AgNO<sub>3</sub> + Vit E, AgNO<sub>3</sub> + Se et AgNO<sub>3</sub> + Vit E + Se



## ( $p \leq 0.01$ ): différence hautement significative entre AgNO<sub>3</sub> et AgNO<sub>3</sub> + Vit E + Se;  
 ++ ( $p \leq 0.01$ ): différence hautement significative entre AgNO<sub>3</sub> + Vit E et AgNO<sub>3</sub> + Vit E + Se;  
 +++ ( $p \leq 0.001$ ): différence très hautement significative entre AgNO<sub>3</sub> + Se et AgNO<sub>3</sub> + Vit E + Se

### 2.1.2. Variations leucocytaires

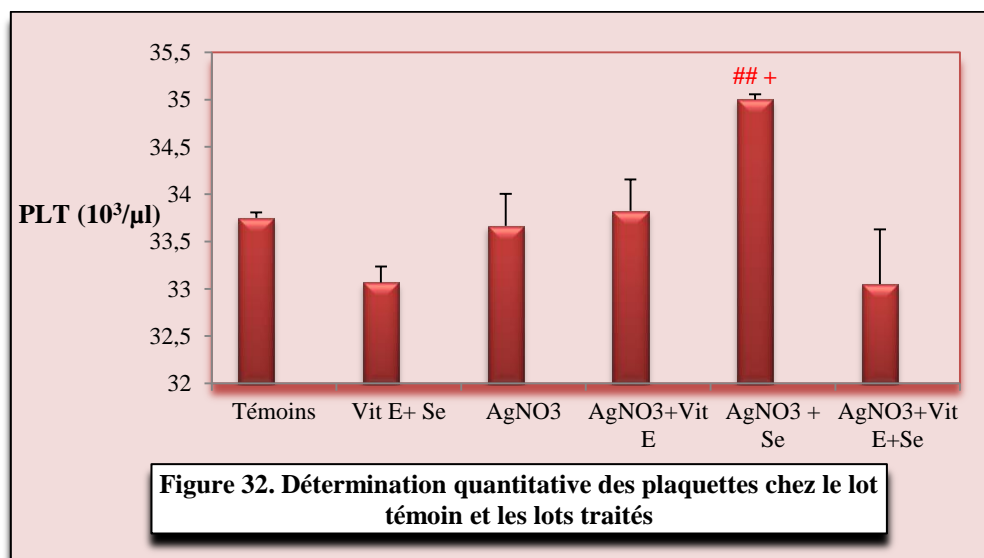
L'exposition à l'argent dans ces conditions d'expérience (durée, concentration) n'a pas induit un changement significatif du nombre total des globules blancs (WBC: white blood cells) dans le sang par rapport à celui des témoins. Mais, ce nombre est abaissé chez le lot AgNO<sub>3</sub> + Vit E + Se d'une façon très hautement significative ( $p \leq 0.001$ ) par rapport aux lots AgNO<sub>3</sub> et AgNO<sub>3</sub> + Se, et d'une façon hautement significative ( $p \leq 0.01$ ) par rapport au lot AgNO<sub>3</sub> + Vit E (figure 31).



### ( $p \leq 0.001$ ): différence très hautement significative entre AgNO<sub>3</sub> et AgNO<sub>3</sub> + Vit E + Se;  
 ++ ( $p \leq 0.01$ ): différence hautement significative entre AgNO<sub>3</sub> + Vit E et AgNO<sub>3</sub> + Vit E + Se;  
 +++ ( $p \leq 0.001$ ): différence très hautement significative entre AgNO<sub>3</sub> + Se et AgNO<sub>3</sub> + Vit E + Se

### 2.1.3. Variations plaquettaires

Les données présentées dans la figure 32 ainsi que le tableau 12 ne montrent aucun désordre sanguin concernant les plaquettes (PLT) chez les animaux intoxiqués par le métal. Elles sont augmentées après administration de sélénium ( $p \leq 0.01$ , AgNO<sub>3</sub>,  $p \leq 0.05$ , AgNO<sub>3</sub> + Vit E + Se).



## ( $p \leq 0.01$ ): différence hautement significative entre AgNO<sub>3</sub> et AgNO<sub>3</sub> + Se;  
 + ( $p \leq 0.05$ ): différence significative entre AgNO<sub>3</sub> + Se et AgNO<sub>3</sub> + Vit E + Se

**Tableau 12.** Variation des autres paramètres de l'hémogramme

Paramètres	Lots expérimentaux					
	Témoins	Vit E + Se	AgNO <sub>3</sub>	AgNO <sub>3</sub> + Vit E	AgNO <sub>3</sub> + Se	AgNO <sub>3</sub> + Vit E + Se
VMC (fl)	52.5 ± 1.22	51 ± 0.82	52 ± 0.82	52.5 ± 0.58 <sup>+++</sup>	57.66 ± 8.01	48.5 ± 0.58 <sup>###</sup>
CCMH (g/dl)	33.75 ± 0.058	33.06 ± 0.2	33.66 ± 0.34	33.82 ± 0.33 <sup>++</sup>	35 ± 0.058	33.05 ± 0.58 <sup>#</sup>
TCMH (pg)	17.75 ± 0.53	16.8 ± 0.28	17.63 ± 0.40	17.77 ± 0.29 <sup>+++</sup>	20.23 ± 3.66	16.15 ± 0.04 <sup>###</sup>
VMP (fl)	6.47 ± 0.05	6.63 ± 0.29	6.46 ± 0.31	6.77 ± 0.26	6.62 ± 0.05	6.62 ± 0.05

VMP: Volume Moyen Plaquettaire

<sup>#</sup>(p ≤ 0.05): différence significative entre AgNO<sub>3</sub> et AgNO<sub>3</sub> + Se;

<sup>##</sup>(p ≤ 0.01): différence hautement significative entre AgNO<sub>3</sub> et AgNO<sub>3</sub> + Se;

<sup>###</sup>(p ≤ 0.001): différence très hautement significative entre AgNO<sub>3</sub> et AgNO<sub>3</sub> + Vit E + Se;

<sup>++</sup>(p ≤ 0.01): différence hautement significative entre AgNO<sub>3</sub> + Vit E et AgNO<sub>3</sub> + Vit E + Se;

<sup>+++</sup>(p ≤ 0.001): différence très hautement significative entre AgNO<sub>3</sub> + Vit E et AgNO<sub>3</sub> + Vit E + Se

## 2.2. Discussion

D'après les résultats, l'argent peut causer une élévation anormale du nombre des hématies au niveau sérique, ces dernières sont responsables de l'oxygénation de toutes les cellules du corps via l'hémoglobine. Cela pourra être expliqué comme suit: le corps des animaux peut prévenir une méthémoglobinémie développée au cours d'une exposition au nitrate d'argent. Plusieurs études ont montré que la toxicité par le nitrate d'argent pourra être la cause directe de cette méthémoglobinémie (Strauch *et al.*, 1969; Humphreys et Routledge, 1998; Chou *et al.*, 1999). De plus, des auteurs ont suggéré que les nitrates présents dans le composé AgNO<sub>3</sub> peuvent induire la formation accrue de méthémoglobine (Kath *et al.*, 2011). Les nitrates peuvent se transformer en nitrites, ces derniers rendent le milieu plus toxique et oxydent l'hémoglobine en méthémoglobine. Le groupement prosthétique ou l'hème de l'hémoglobine contient l'atome de fer à l'état réduit ou l'état ferreux (Fe<sup>2+</sup>), sous cette forme, le fer peut se combiner avec l'oxygène en assurant son transport. Au cas contraire ou lors d'une oxydation de l'hémoglobine par perte d'électron en se convertissant à l'état ferrique (Fe<sup>3+</sup>) ou méthémoglobine. Dans ce cas, l'hème est incapable de se lier à l'oxygène ce qui peut conduire à une hypoxémie qui est la diminution de la quantité d'oxygène transportée par les globules rouges dans le sang. L'oxygénation des organes et des tissus est alors insuffisante, et il peut en résulter une souffrance des cellules constituant les organes atteints (Harris *et al.*, 1979). Dans les conditions physiologiques le méthémoglobine se réduit en hémoglobine par la méthémoglobine réductase, mais en présence de produits toxiques cette réduction pourra être influencée (Ciji *et al.*, 2013). Après trois mois d'administration par voie orale à faible dose, on ne parlera pas d'une méthémoglobinémie proprement dite en absence de signes cliniques

associés essentiellement un changement de la coloration de la peau ainsi qu'un changement de la coloration rouge du sang vers une coloration brune mais en cas d'exposition chronique, ce phénomène se développe d'une façon progressive pour cela une élévation de nombre des érythrocytes pourra être la conséquence d'une production accrue d'érythropoïétine rénale en réponse à une hypoxie, qui elle-même va stimuler la production intramédullaire de cellules de la lignée érythroïde (Jelkman, 2011). Une autre cause de surproduction des globules rouges pourra être due à un désordre médullaire, mais kim *et al.* (2008) ont montré que l'argent n'a induit aucune génotoxicité des érythrocytes ou bien de la moelle osseuse.

Toutefois, nous n'avons aucune modification significative concernant le nombre total des globules blancs et les plaquettes chez les animaux traités seulement par l'argent.

Si on compare nos résultats avec d'autres études, on cite à titre d'exemple l'étude de Munger *et al.* (2014) chez l'homme, les auteurs n'ont trouvé aucune altération des paramètres hématologiques après traitement par le métal. De même, Galvez *et al.* (2001) n'ont pas trouvé une hématotoxicité induite par l'argent chez le poisson, contrairement, Cheraghi *et al.* (2013) ont noté une chute des paramètres érythrocytaires et leucocytaires ainsi qu'une thrombocytose chez la souris, une augmentation significative de l'hémoglobine et non significative de l'hématocrite et des globules rouges, ainsi que l'élévation des plaquettes et des globules blancs ont été notées par Sarhan et Hussain (2014) chez le rat.

Outre, la vitamine E et le sélénium sont des micronutriments dont un apport alimentaire quotidien est indispensable, chacun des deux occupe des activités biologiques fondamentales. En hématologie la vitamine E participe à la stabilisation des membranes des érythrocytes et leur synthèse par modulation de la synthèse de l'hème, elle améliore aussi l'activité enzymatique méthémoglobine réductase (Magnin, 1992; Ciji *et al.*, 2013). Le sélénium a aussi un rôle dans la production des érythrocytes, Une déficience en sélénium semble cependant causer une légère diminution de l'érythropoïèse (Fontaine *et al.*, 1977). La co-existence de vitamine E et de sélénium apparaît améliorer les paramètres globulaires tels que le nombre des hématies, l'hématocrite et l'hémoglobine en protégeant les cellules en cas de méthémoglobinémie pourra être causée par l'argent. En passant au nombre total des leucocytes, nous avons démontré que chaque antioxydant a entraîné une amélioration de la réponse immunitaire par élévation du nombre des globules blancs. D'après la littérature, l' $\alpha$ -tocophérol et le sélénium sont des immuno-modulateurs. La supplémentation en vitamine E a permis d'améliorer la réponse immunitaire chez l'homme et le rat âgés (Wu *et al.*, 2000). La vitamine E a permis de réduire l'activité suppressive des lymphocytes T et d'augmenter la sécrétion d'interleukine 2 chez la souris infectée par le virus de l'immunodéficiences murine

(Wang *et al.*, 1994<sup>a</sup>). Le sélénium de sa part stimule la formation des anticorps, la production de médiateurs (cytokines) et l'activité de nombreuses cellules immunocompétentes telles que les lymphocytes T auxiliaires, T cytotoxiques, les cellules NK.....etc. Une carence en sélénium peut contribuer à accroître la vulnérabilité aux infections bactériennes et aux maladies virales (Beck, 2007; Iglesias *et al.*, 2013). Malgré cela, on assiste à une réponse immunitaire moins importante après la combinaison de ces deux antioxydants, cela pourra désigner un état inflammatoire ou infectieux moins notable grâce à leur travail synergique.

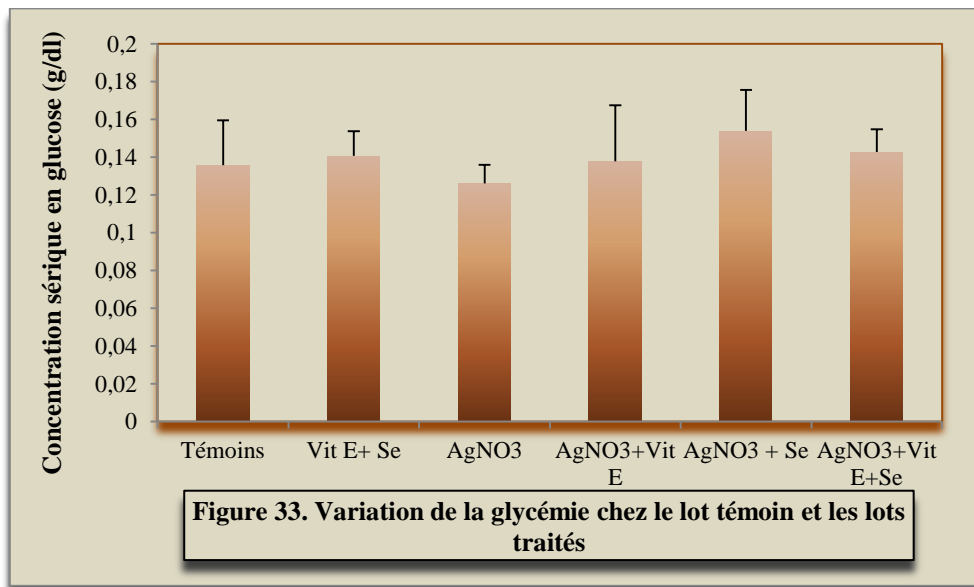
Cette synergie est aussi impliquée dans le maintien du nombre des plaquettes, la vitamine E et le sélénium peuvent prévenir les maladies cardiovasculaires. Le premier agit à différents niveaux sur le métabolisme des eicosanoïdes. Par son action inhibitrice sur la phospholipase A<sub>2</sub>, elle bloque la libération de l'acide arachidonique membranaire, principal précurseur des eicosanoïdes. La vitamine E intervient aussi en modulant les activités de la cyclooxygénase et de la lipooxygénase, enzymes clés de la synthèse des eicosanoïdes. La vitamine E augmente la production, par les cellules endothéliales, de prostacycline, puissant vasodilatateur et inhibiteur de l'agrégation plaquettaire et de l'adhérence des leucocytes à l'endothélium. Elle réduit, par inhibition de la cyclooxygénase, la synthèse par les plaquettes de thromboxane A<sub>2</sub>, agent vasoconstricteur et agrégeant plaquettaire et de la prostaglandine E<sub>2</sub> des macrophages. Par tous ces effets, la vitamine E participe efficacement à la protection contre le processus athéromateux (Feki *et al.*, 2001). Chez les sujets atteints de cardiomyopathie, on constate un effondrement du taux sanguin en sélénium. La baisse de sélénium entrave la synthèse des prostaglandines, favorisant ainsi l'agrégation plaquettaire. Cette baisse augmente les risques d'infarctus ou de thrombose (Watts, 1994).

**3. Explorations biochimiques**

**3.1. Résultats**

**3.1.1. Glycémie**

Les résultats n’ont pas montré une modification significative de la glycémie sous l’exposition à l’argent comparé aux témoins de même que la supplémentation en sélénium et en vitamine E comme le montre la figure 33.



**Figure 33. Variation de la glycémie chez le lot témoin et les lots traités**

**3.1.2. Bilan hépatique**

Aucune différence significative n’a été obtenue concernant l’activité enzymatique des 2 transaminases (figures 34, 35).

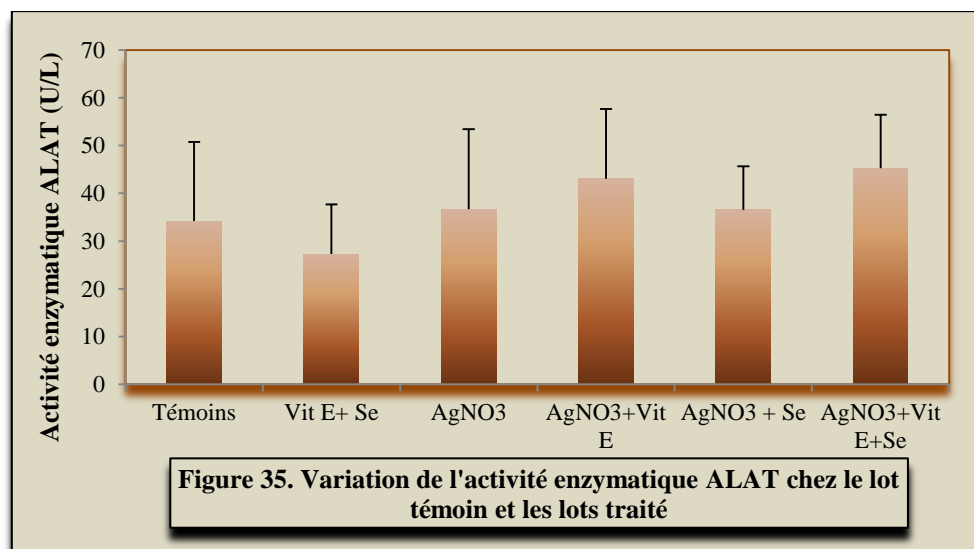
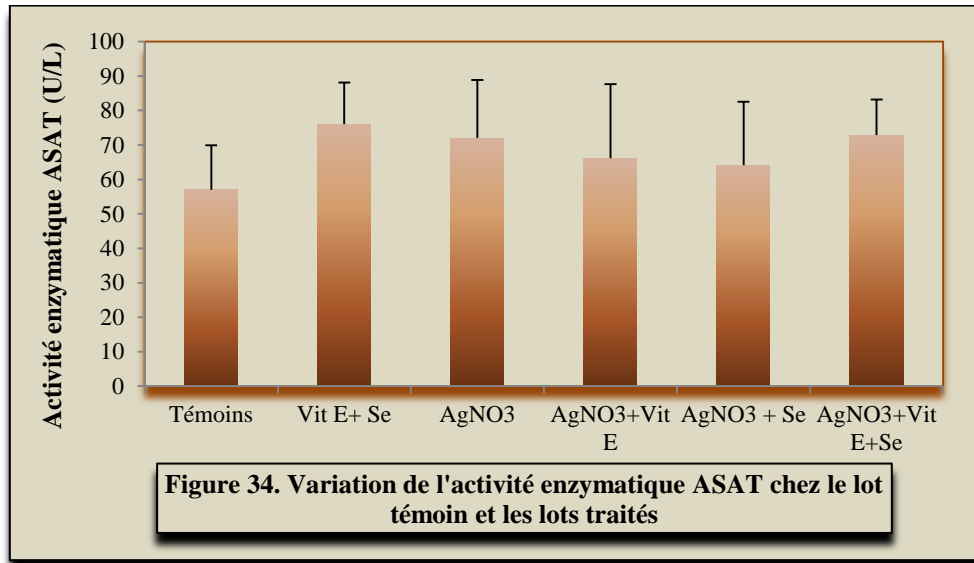
La figure 36 indique que l’AgNO<sub>3</sub> a induit la réduction significative ( $p \leq 0.05$ ) de l’activité PAL, alors que le sélénium a augmenté cette activité ( $p \leq 0.01$ ).

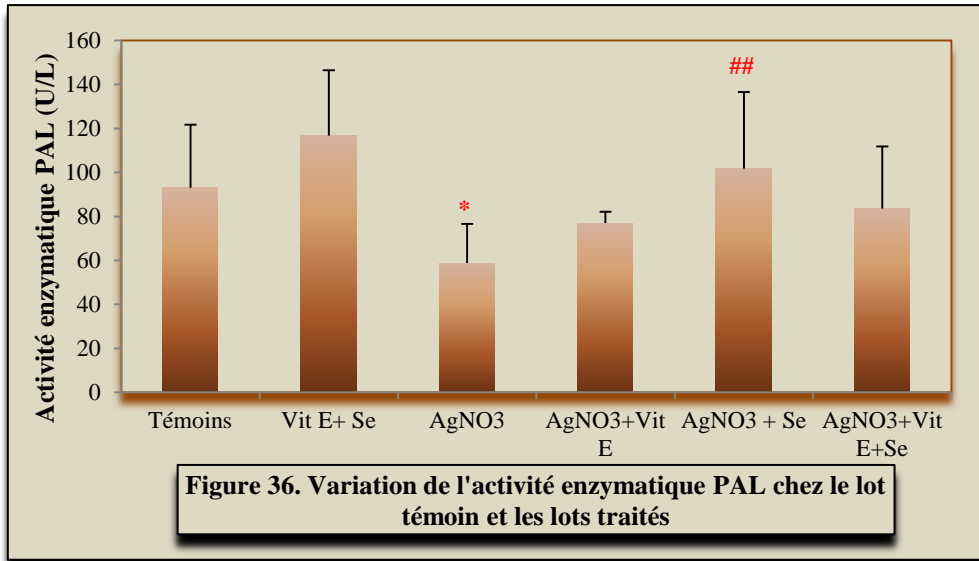
Le seul changement significatif de la bilirubine directe est la diminution remarquable ( $p \leq 0.01$ ) chez le lot supplémenté par la vitamine E par rapport au lot AgNO<sub>3</sub> + Vit E + Se (figure 37).

D’après nos résultats (figure 38), le métal peut causer l’élévation significative ( $p \leq 0.05$ ) de l’activité LDH. Au contraire, l’assemblage d’ $\alpha$ -tocophérol et de sélénium a abaissé cette activité ( $p \leq 0.01$ ).

Les protéines totales au niveau sérique ont diminué chez les animaux dont l’eau de boisson est supplémenté en argent, mais ce paramètre a reconnu une amélioration en présence de la vitamine E ( $p \leq 0.05$ , AgNO<sub>3</sub>) et en présence de sélénium ( $p \leq 0.01$ , AgNO<sub>3</sub> et  $p \leq 0.01$ , AgNO<sub>3</sub> + Vit E + Se).

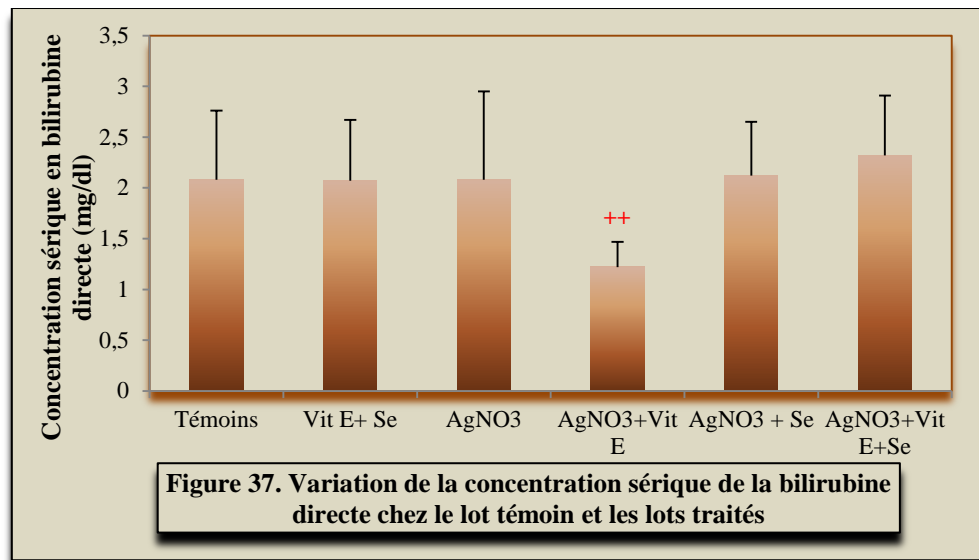
Les valeurs d'albumine ont été sans modification significative entre les 5 groupes les uns des autres. Les 2 figures 39 et 40 illustrent la variation de ces 2 paramètres.



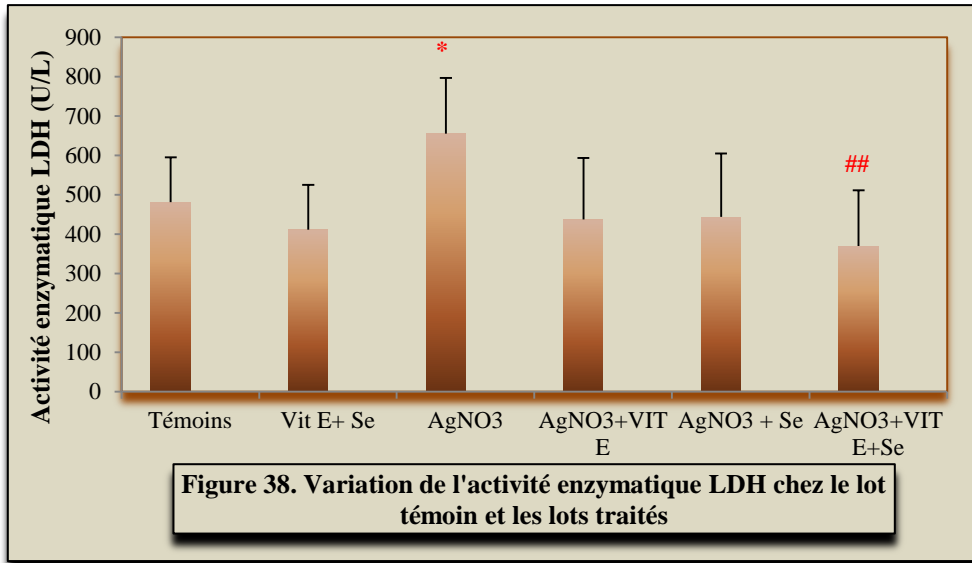


\* ( $p \leq 0.05$ ): différence significative entre AgNO<sub>3</sub> et témoins;

## ( $p \leq 0.01$ ): différence hautement significative entre AgNO<sub>3</sub> et AgNO<sub>3</sub> + Se

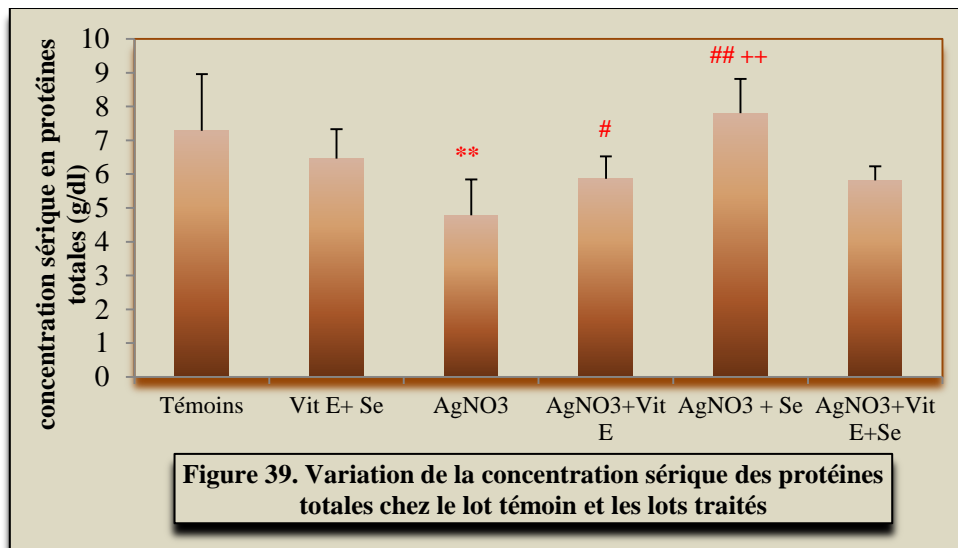


++ ( $p \leq 0.01$ ): différence hautement significative entre AgNO<sub>3</sub> + Vit E et AgNO<sub>3</sub> + Vit E + Se



\* ( $p \leq 0.05$ ): différence significative entre AgNO<sub>3</sub> et témoins;

## ( $p \leq 0.01$ ): différence hautement significative entre AgNO<sub>3</sub> et AgNO<sub>3</sub> + Vit E + Se

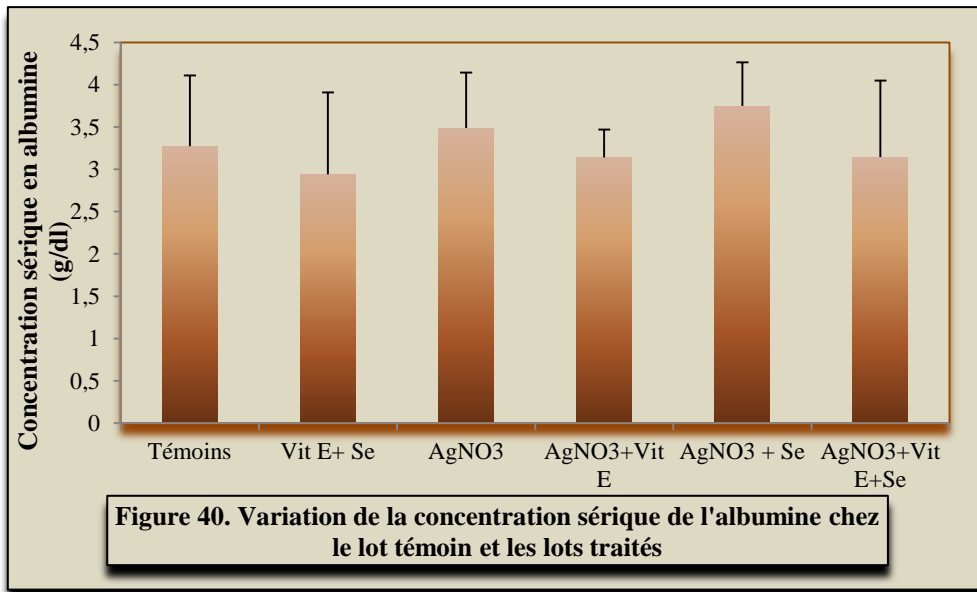


\*\* ( $p \leq 0.01$ ): différence hautement significative entre AgNO<sub>3</sub> et témoins;

# ( $p \leq 0.05$ ): différence significative entre AgNO<sub>3</sub> et AgNO<sub>3</sub> + Vit E;

## ( $p \leq 0.01$ ): différence hautement significative entre AgNO<sub>3</sub> et AgNO<sub>3</sub> + Vit E + Se;

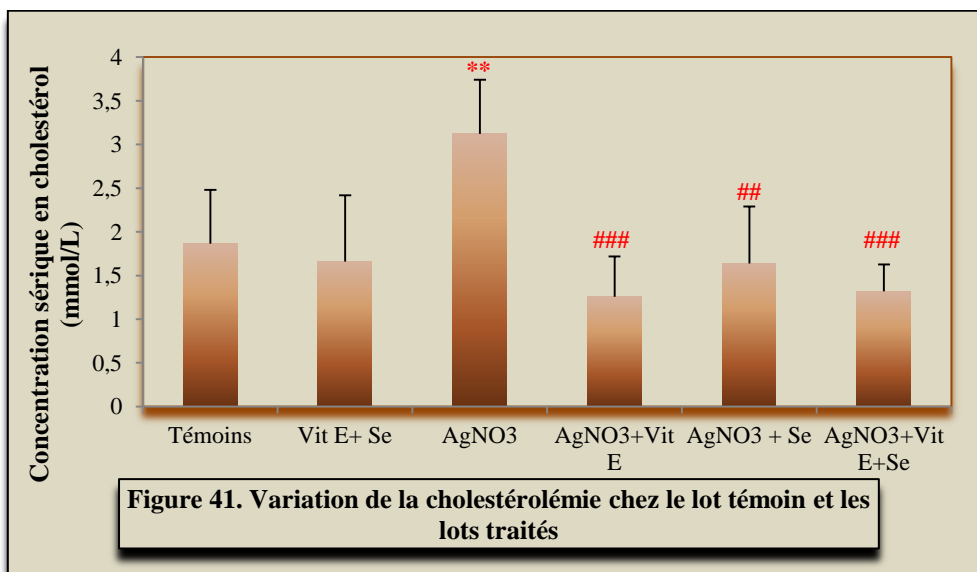
++ ( $p \leq 0.01$ ): différence hautement significative entre AgNO<sub>3</sub> + Se et AgNO<sub>3</sub> + Vit E + Se



### 3.1.3. Bilan lipidique

L'argent peut causer une hypercholestérolémie ( $p \leq 0.01$ , témoins), alors que celle-ci est rendu à la norme par un abaissement notable grâce aux antioxydants contre le métal ( $p \leq 0.001$ , AgNO<sub>3</sub> + vit E, AgNO<sub>3</sub> + vit E + Se et  $p \leq 0.01$ , AgNO<sub>3</sub> + Se) (figure 42).

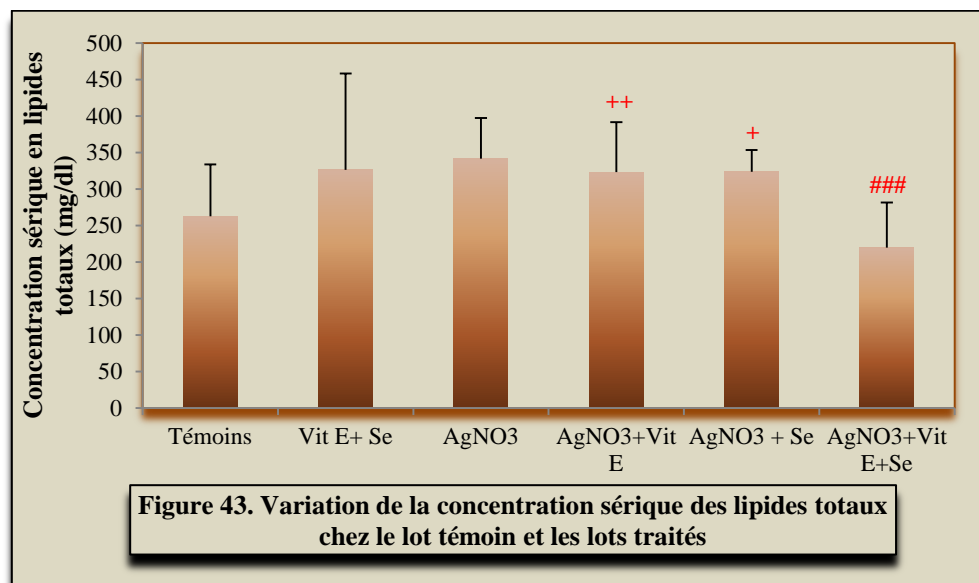
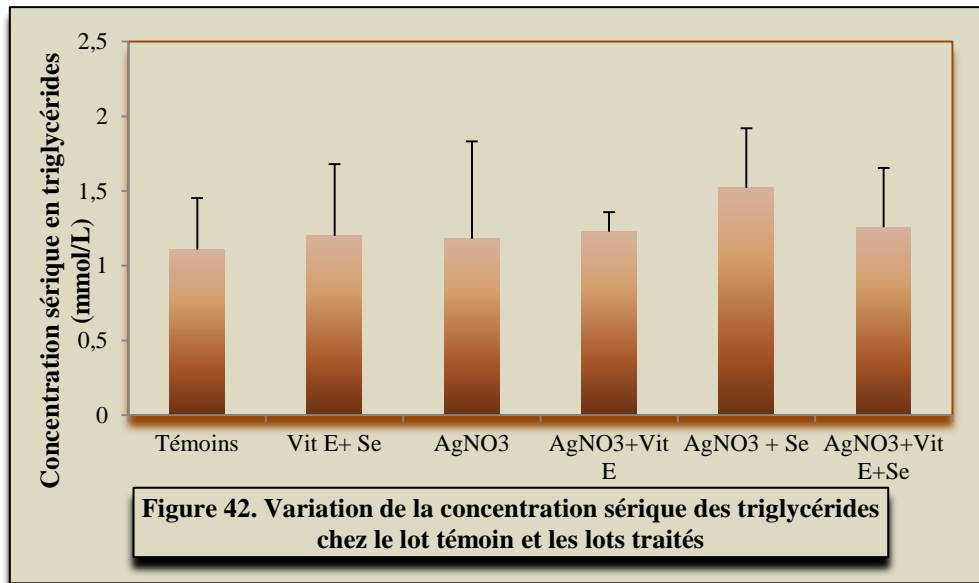
Tandis que les triglycérides ne sont pas affectés et ne présentent aucune modification remarquable (figure 43). A leur tour, les lipides totaux ne sont pas variés significativement après administration d'argent, mais la vitamine et l'oligo-élément en association ont abaissé leur taux par rapport au groupe AgNO<sub>3</sub> ( $p \leq 0.001$ ), AgNO<sub>3</sub> + Se ( $p \leq 0.05$ ) et AgNO<sub>3</sub> + Vit E ( $p \leq 0.01$ ) (figure 44).



\*\* ( $p \leq 0.01$ ): différence hautement significative entre AgNO<sub>3</sub> et témoins;

## ( $p \leq 0.01$ ): différence hautement significative entre AgNO<sub>3</sub> et AgNO<sub>3</sub> + Se;

### ( $p \leq 0.001$ ): différence très hautement significative entre AgNO<sub>3</sub> + Se, AgNO<sub>3</sub> + Vit E + Se et AgNO<sub>3</sub>



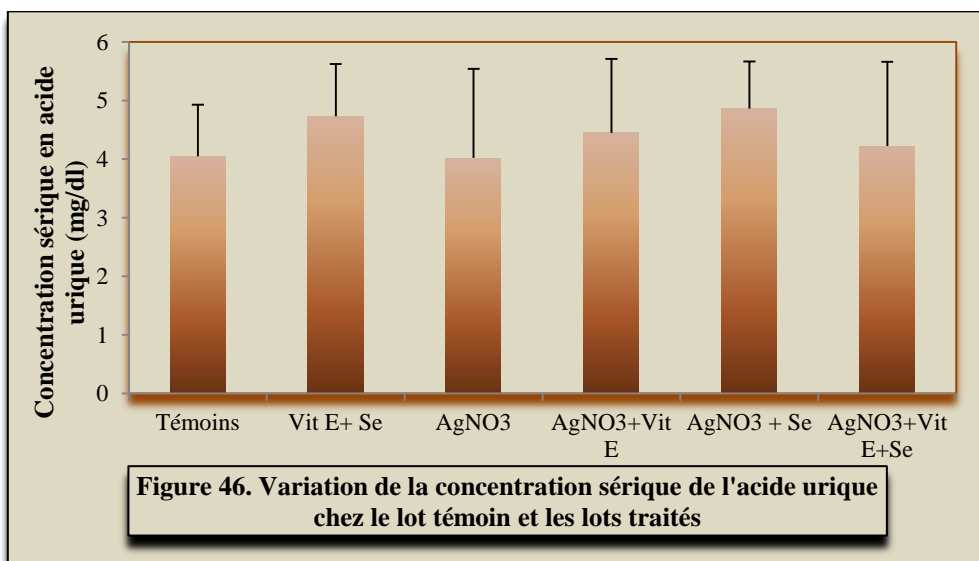
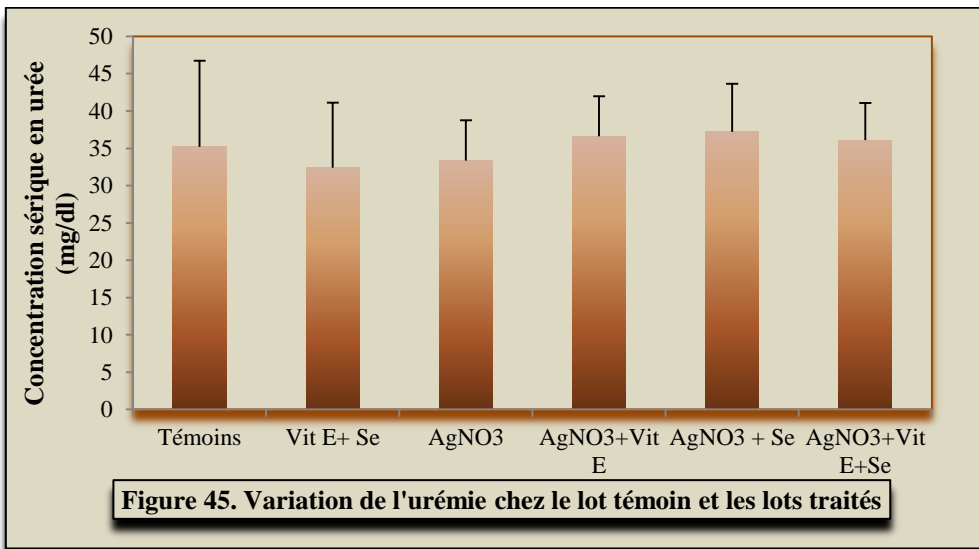
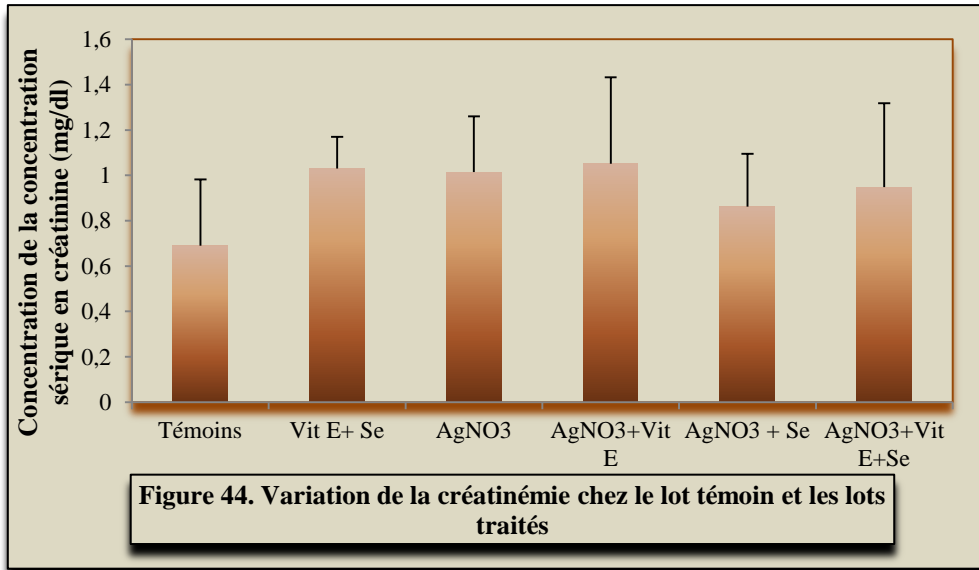
### ( $p \leq 0.001$ ): différence très hautement significative entre AgNO<sub>3</sub> et AgNO<sub>3</sub> + Vit E + Se;

+ ( $p \leq 0.05$ ): différence significative entre AgNO<sub>3</sub> + Se et AgNO<sub>3</sub> + Vit E + Se;

+++ ( $p \leq 0.01$ ): différence hautement significative entre AgNO<sub>3</sub> + Vit E et AgNO<sub>3</sub> + Vit E + Se

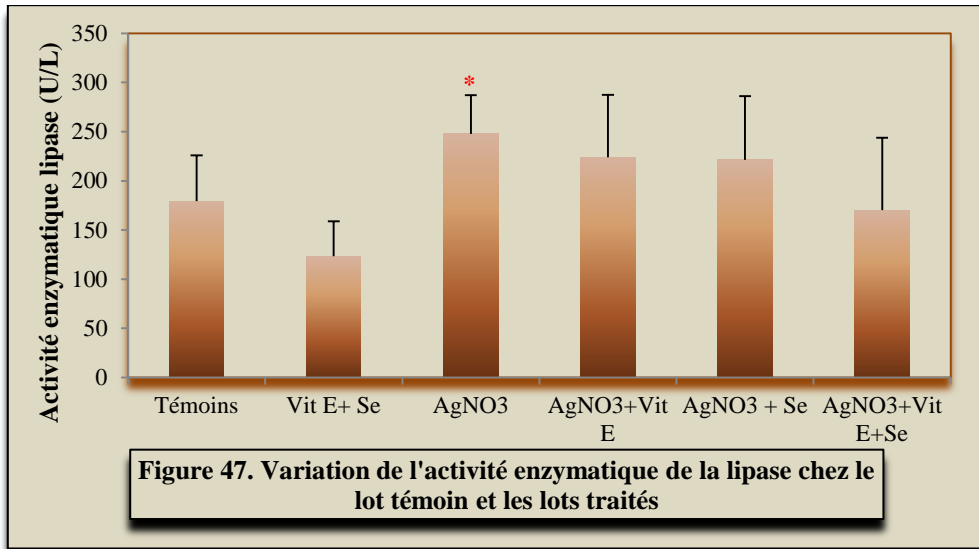
### 3.1.4. Bilan rénal

Le bilan rénal inclus la créatinine, l'urée et l'acide urique n'a présenté aucune altération significative de chacun de ces paramètres suite aux traitements utilisés comme montré dans les figures 44, 45 et 46.

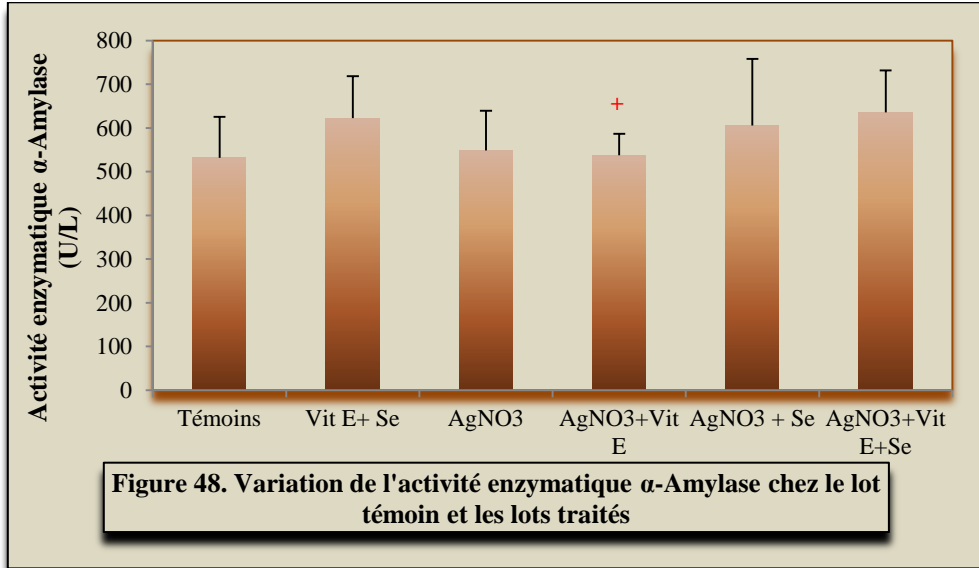


3.1.5. Exploration de la fonction pancréatique

La fonction pancréatique pourra être estimée par la lipase qui a augmenté significativement ( $p \leq 0.05$ ) chez le lot  $AgNO_3$ , elle est estimée aussi par l' $\alpha$ -amylase qui a présenté juste une diminution significative ( $p \leq 0.05$ ) chez le lot  $AgNO_3 + Vit E$  comparé au lot  $AgNO_3 + Vit E + Se$  (figures 47 et 48).



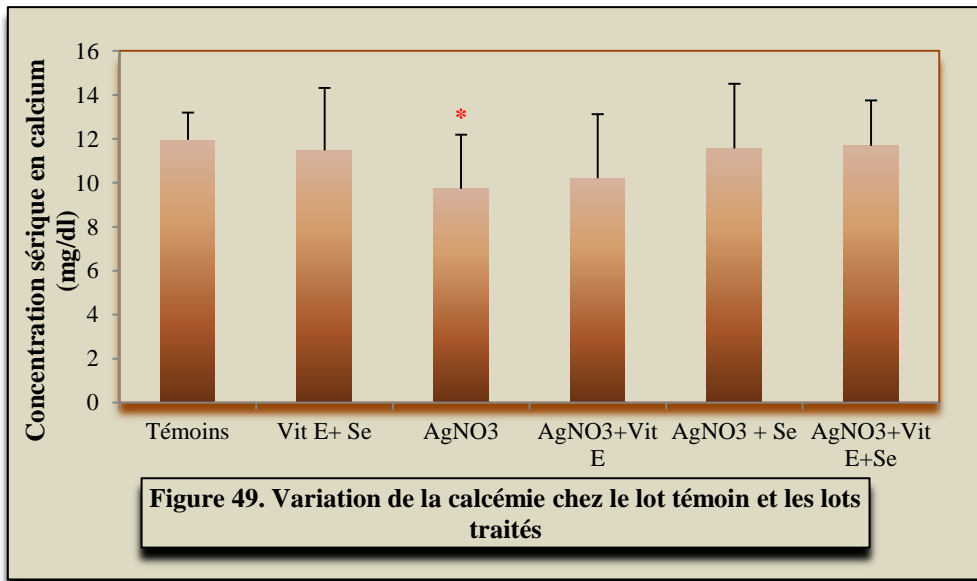
\*( $p \leq 0.05$ ): différence significative entre  $AgNO_3$  et témoins



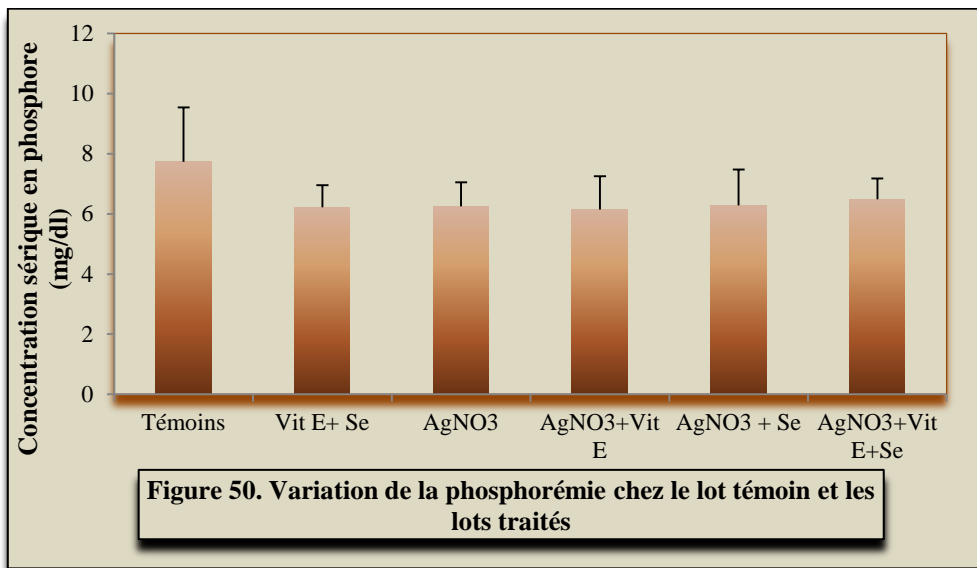
+ ( $p \leq 0.05$ ): différence significative entre  $AgNO_3 + Vit E$  et  $AgNO_3 + Vit E + Se$

3.1.6. Quelques électrolytes sanguins

Parmi les électrolytes mesurés dans le sang, on a évalué la variation de la calcémie qui a reconnu une réduction significative ( $p \leq 0.05$ ) chez les animaux traités par le métal. En plus nous n'avons observé aucune variation significative de la phosphorémie sous les différents traitements (figures 49 et 50).



\*( $p \leq 0.05$ ): différence significative entre AgNO<sub>3</sub> et témoins



### 3.2. Discussion

La concentration en glucose sanguin est maintenue à l'intérieur de limites relativement étroites dans différentes situations (absorption de nourriture, jeûne ou exercice intense) par des hormones régulatrices comme l'insuline, le glucagon ou l'épinéphrine. Le dosage du glucose est un des tests les plus fréquemment réalisés conjointement avec d'autres tests de tolérance (épreuve d'hyperglycémie provoquée, glycémie post-prandiale...). Comme première remarque et d'après nos résultats, nous pouvons déduire que le métal n'a pas un effet délétère sur le métabolisme glucidique.

D'après le bilan hépatique, nous n'avons pas détecté aucune variation en ce qui concerne les amino-transférases, la bilirubine et l'albumine, contrairement, une réduction de l'activité PAL

et du teneur en protéines totales ainsi qu'une augmentation de l'activité LDH ont été reconnues dans le sérum des animaux sous l'influence d'argent.

Si on tient compte à la PAL, cet enzyme appartient à la famille des hydrolases peu spécifiques catalysant l'hydrolyse d'esters phosphoriques variés à pH alcalins, elles libèrent un mole d'orthophosphate, un alcool, un phénol et un ose à partir d'un substrat phosphoré naturel ou synthétique, elles présentent dans de nombreux tissus, dont les os, le foie, les reins, les globules blancs et le placenta mais en quantités importantes dans l'intestin chez le rat (Evans *et al.*, 2009). Elle joue un rôle important au cours des réactions d'hydrolyse d'esters phosphoriques se produisant au cours du métabolisme des glucides et des phospholipides....Elles pourraient également attribuer au transport actif des phosphates inorganiques au travers des membranes cellulaires. Elles interviennent dans certains processus de transformation cellulaire et au niveau des fonctions sécrétoires. Elles sont situées exclusivement au niveau des membranes cytoplasmiques (Henny et Schiele, 1981).

La diminution notable peut refléter des altérations de la synthèse protéique et de la phosphorylation oxydative ce qui est en accord avec les autres examens (Al-Attar, 2004), une hypothyroïdie, une hypoparathyroïdie, et/ou un désordre gastro-intestinal sont parmi les causes les plus importantes (Young, 1995).

De plus, de fortes activités du LDH se trouvent dans le foie, le cœur, les reins, les muscles squelettiques et les érythrocytes, cette enzyme catalyse la réaction d'oxydation de L-lactate en pyruvate en présence du cofacteur  $\text{NAD}^+$ , mais elle catalyse aussi la réaction réversible. Son élévation pourra être attribuée à une synthèse accrue de cette enzyme, une cardiopathie ou un trouble lié au tissu musculaire (Burtis et Ashwood, 1999; Al-Attar, 2004). En outre, le taux en LDH indique les besoins en énergie, une haute activité pourra être le résultat d'une respiration cellulaire anaérobie comme déjà illustré par d'autres investigations trouvés une diminution de la consommation en oxygène ainsi qu'une diminution des activités enzymatiques de la chaîne respiratoire au niveau hépatique à des fortes activités en LDH et en glucose-6-phosphate déshydrogénase (Al-Attar, 2004), cela est en corrélation avec l'augmentation significative des globules rouges chez le même lot.

Les protéines totales sériques renferment les albumines et les globulines, une faible concentration peut refléter un changement du métabolisme protéique cela pourra être causé par une hypothyroïdie, l'oxydation des protéines par les radicaux libres pouvant être générés par le métal constitue aussi un risque de les dénaturer entraînant ainsi son abaissement (Das et Dasgupta, 2000).

Une hypercholestérolémie a été enregistrée suite à une intoxication par le métal, le cholestérol synthétisé principalement par le foie, est nécessaire comme précurseur des hormones stéroïdiennes, des acides biliaires ainsi qu'un stabilisateur des membranes biologiques, une haute concentration sérique signifie un risque d'atteinte cardiaque, on peut citer parmi les causes; une hyperlipoprotéïnémie ou une hypothyroïdie (Kim *et al.*, 2010). En revanche, nous n'avons pas assisté à une élévation significative des triglycérides et des lipides totaux.

Le bilan rénal a pour but d'estimer la fonction rénale et plus précisément la filtration glomérulaire, ce bilan inclus l'urée, la créatinine et l'acide urique au niveau sérique n'a pas été affecté par l'argent. Donc, ce dernier n'a pas entraîné une insuffisance rénale fonctionnelle dans ces conditions d'expérience.

Nous avons évalué la fonction pancréatique par le dosage d' $\alpha$ -amylase et de lipase. Dans notre étude, l'activité de l'insuline est déjà estimée via la glycémie; aucune altération n'a été remarquée de même que l' $\alpha$ -amylase, tandis que la lipase a reconnu une augmentation significative, cette enzyme pancréatique joue un rôle dans l'hydrolyse des glycérides en glycérol et acides gras libres, certes, des perturbations de l'activité enzymatique peuvent refléter des maladies du pancréas (McNeely, 1984), mais le fait que la glycémie et l'activité de l' $\alpha$ -Amylase sont à la norme, cette élévation répond donc à un désordre du métabolisme lipidique ou dyslipidémie ce qui est en corrélation avec l'hypercholestérolémie obtenue.

Parmi les électrolytes dans le sang, nous avons analysé le calcium, une hypocalcémie a été notée pourra refléter une malabsorption intestinale ou une hypoparathyroïdie (Clarck *et al.*, 1975). En outre, parmi les études qui ont aussi intéressé à la variation des paramètres biochimiques après administration orale, l'EPA (1980) qui a reporté que les ions d'argent ont altéré l'activité des enzymes sériques. Chez l'homme, une inhibition des enzymes marquantes de la fonction hépatique ainsi qu'une réduction de profil lipidique et de la glycémie ont été remarquées par Sharma *et al.* (1997), en revanche, les paramètres suivants: sodium, potassium, chlore, dioxyde de carbone, urée, créatinine, glucose, PAL, ASAT, ALAT, protéines totales, bilirubine totale, albumine et calcium n'ont été pas influencés après 14 jours de traitement oral par l'argent (Munger *et al.*, 2014).

Chez le rat, une augmentation du cholestérol, LDL-cholestérol, PAL, ALAT, et une diminution des triglycérides ont été révélées par des investigateurs (Ebabe Elle *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2010; Park *et al.*, 2010). Mais Van Der Zande *et al.* (2012) et Kulthong *et al.* (2012) n'ont observé aucune variation de ces paramètres essentiellement les enzymes sériques. La fonction rénale apparait à son tour sans troubles remarquables via l'analyse des examens mentionnés précédemment (Kim *et al.*, 2010; Hadrup *et al.*, 2012<sup>a</sup>).

Cependant, d'après les interprétations ci-dessus et d'après la variété des résultats obtenus par les autres études, la cytotoxicité engendrée par ce métal paraît avoir plusieurs origines et causes. Dans ces conditions, on ne peut pas parler d'une nécrose ou des dommages hépatiques proprement dites provoqués par le métal. De plus, des études ont prouvé les effets toxiques d'argent sur différents organes comme les intestins, les os et le cœur (Olcott, 1950; Ham et Tange, 1972; Walker, 1972; Jeong *et al.*, 2010; Loeschner *et al.*, 2011).

Toutefois, nous pouvons proposer qu'une hypothyroïdie en cours est causée par l'argent (troubles des 2 métabolismes: lipidique et protéique, augmentation de l'activité LDH et diminution de l'activité PAL). Cela est renforcé par des recherches qui ont mis en considération le traitement des patients par la thyroxine (souffrant une insuffisance thyroïdienne) et l'argent colloïdal simultanément, ce dernier peut interférer l'absorption de cette hormone pouvant induire une hypothyroïdie. De plus, la présence de métaux lourds dans les tissus altérera la sensibilité entre l'hormone T3 et les cellules du corps. L'argent a été aussi trouvé accumuler dans des parties de la thyroïde (Fung et Bowen, 1996).

Pour expliquer cette proposition, on prend en compte aussi les interactions connues entre l'argent et le sélénium pouvant conduire à un déficit en ce dernier qui a un rôle indispensable dans la synthèse des hormones thyroïdiennes, plusieurs recherches sur l'homme et l'animal ont constaté une dysthyroïdie en cas de déficit en cet élément (Beckett *et al.*, 1987; Vadhanavikit *et al.*, 1990). La 5'-désiodase I, enzyme catalysant la conversion de la T4 en T3, notamment dans la thyroïde, le foie et le rein, fournit la plupart de la T3 circulante d'origine hépatique. Il y a quelques années, un lien fut établi entre cette enzyme et le sélénium. Par la suite, la 5'-désiodase I fut identifiée comme une sélénoenzyme. Le sélénium se trouve dans le site actif de la 5'-désiodase I sous forme de résidu sélénocystéine (Hmidi *et al.*, 1996). L'altération du statut thyroïdien, traduite par une valeur de T4 circulante élevée alors que celle de T3 est légèrement abaissée ou pratiquement inchangée, observée dans les conditions de carence nutritionnelle en sélénium chez différents animaux, témoigne aussi de l'importance de cet oligoélément dans la fonction thyroïdienne (Hmidi *et al.*, 1996).

Nous avons intéressé aussi aux changements de l'examen biochimique en présence des deux antioxydants, ces deux derniers se trouvent soit normaliser soit améliorer les paramètres mentionnés précédemment. D'après l'EPA (1980), l'argent s'interagit compétitivement avec le sélénium et l' $\alpha$ -tocophérol.

De même, des travaux ont prouvé l'altération d'un nombre de paramètres biochimiques dans le sang et les tissus suite à une carence en vitamine E et/ou en sélénium (Catignani *et al.*, 1968; Reiter and Wendel, 1983; Chow, 1985).

Le maintien de l'oxygénation reflétée par amélioration de la synthèse des globules rouges pourra être en considération avec l'abaissement de l'activité LDH par rapport au lot AgNO<sub>3</sub>. L'abaissement du profil lipidique et principalement le cholestérol pourra être inclus dans les mécanismes suivis par les deux micronutriments pour faire prévenir les maladies cardiovasculaires (Pincemail *et al.*, 1990).

D'après nos résultats, la supplémentation en sélénium et/ou en vitamine E apparait inhiber les désordres pouvant être due à l'insuffisance thyroïdienne.

En outre, une étude histopathologique et une analyse des biomarqueurs du stress oxydant au niveau du foie, reins, testicules et cerveau sont nécessaires pour dépister une affection par le métal afin de pouvoir mettre en œuvre le mécanisme de toxicité suivi ainsi qu'apprécier les activités antioxydantes de la vitamine E et de sélénium contre le métal au niveau de chaque organe mentionné ci-dessus.

#### 4. Dépistage d'une hépatotoxicité et appréciation de l'activité antioxydante de la vitamine E et du sélénium

##### 4.1. Résultats

##### 4.1.1. Marqueurs biologiques du stress oxydant

###### ➤ La peroxydation lipidique

Le degré de la peroxydation lipidique est estimé par la mesure de la concentration tissulaire en malondialdéhydes ou plus précisément les TBARS, des valeurs inchangées proches à celles de témoins sont remarquées chez les rats intoxiqués par l'argent, de même que les autres lots à l'exception des animaux supplémentés seulement par la vitamine E qui ont caractérisé par des taux moins importants ( $p \leq 0.01$ :  $\text{AgNO}_3$  et  $\text{AgNO}_3 + \text{Vit E} + \text{Se}$ ) comme le montre la figure 51:

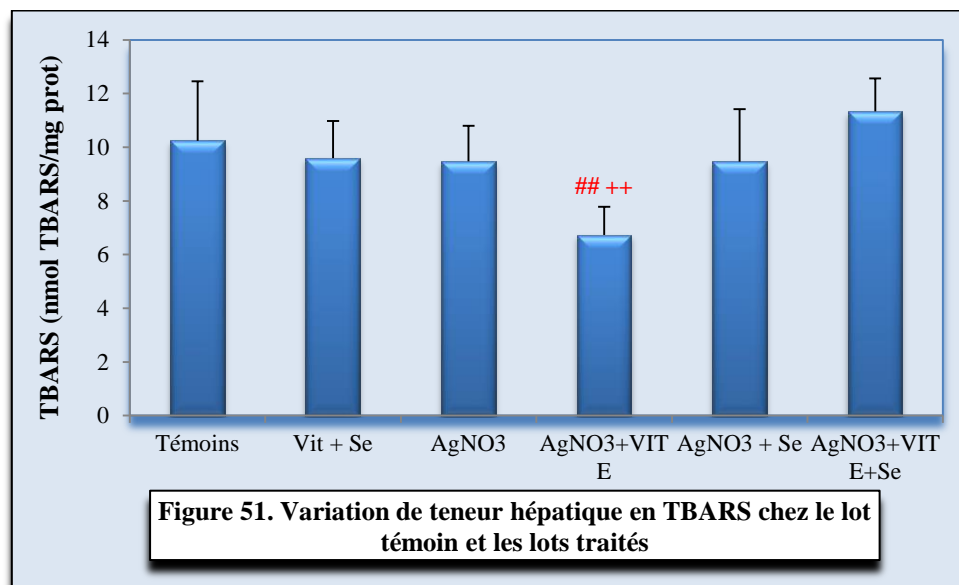


Figure 51. Variation de teneur hépatique en TBARS chez le lot témoin et les lots traités

<sup>##</sup>( $p \leq 0.01$ ): différence hautement significative entre  $\text{AgNO}_3$  et  $\text{AgNO}_3 + \text{Vit E}$ ;

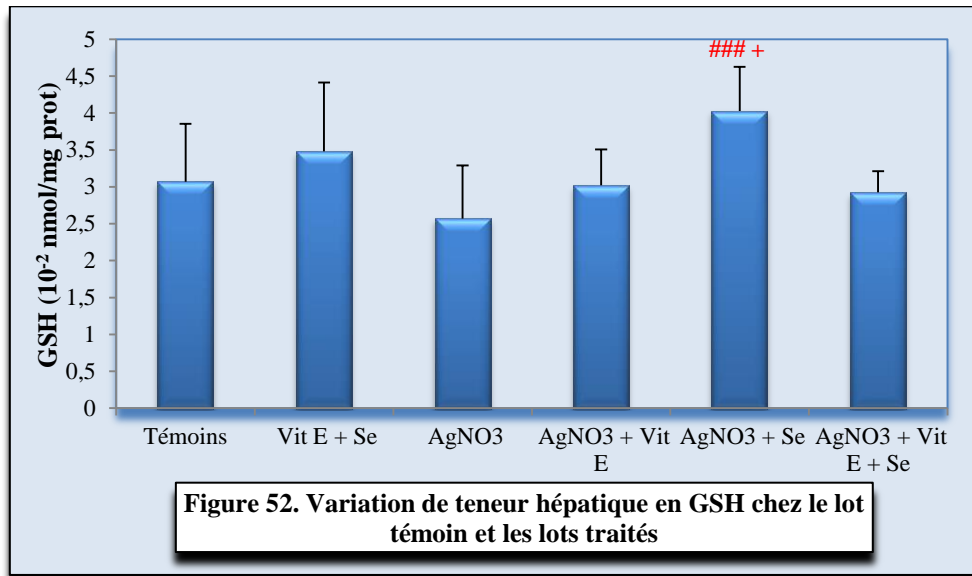
<sup>++</sup>( $p \leq 0.01$ ): différence hautement significative entre  $\text{AgNO}_3 + \text{Vit E}$  et  $\text{AgNO}_3 + \text{Vit E} + \text{Se}$

###### ➤ Les antioxydants non enzymatiques

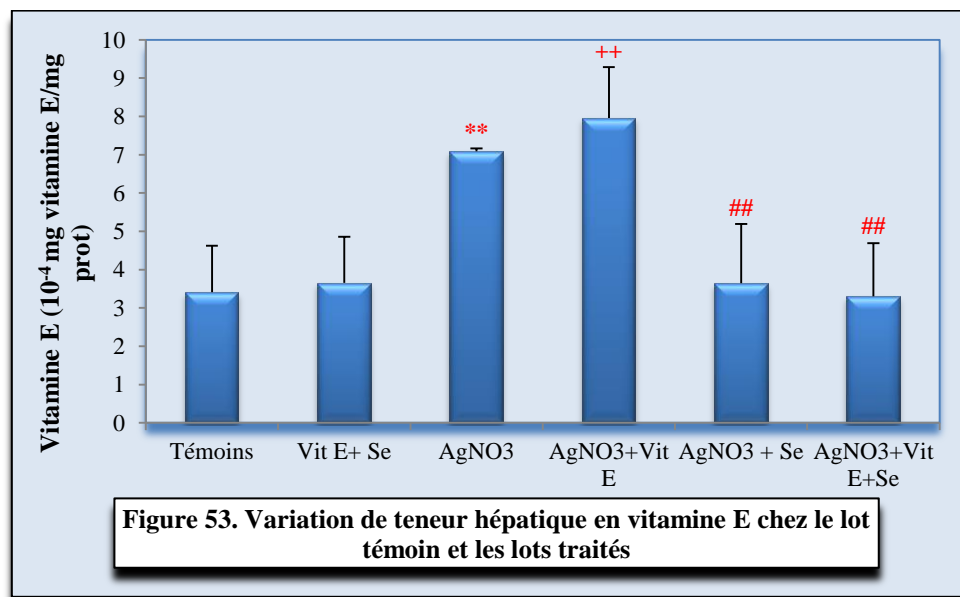
La concentration de GSH hépatique a présenté une diminution non significative après ingestion orale du métal. Au cas contraire et après addition des micronutriments, essentiellement le sélénium, une élévation notable a été enregistrée ( $p \leq 0.001$ :  $\text{AgNO}_3$ ,  $p \leq 0.05$ :  $\text{AgNO}_3 + \text{Vit E} + \text{Se}$ ).

Concernant la teneur en vitamine E, cette dernière a augmenté d'une façon hautement significative ( $p \leq 0.01$ ) après exposition au métal par rapport aux rats non traités, Cependant, on assiste à un abaissement chez les deux lots:  $\text{AgNO}_3 + \text{Se}$  et  $\text{AgNO}_3 + \text{Vit E} + \text{Se}$  ( $p \leq 0.01$ ) par rapport à l' $\text{AgNO}_3$ . Une alimentation enrichie seulement par cette vitamine a fait augmenter sa concentration dans le foie ( $p \leq 0.01$ :  $\text{AgNO}_3 + \text{Vit E} + \text{Se}$ ).

Les 2 figures 52 et 53 résument les principales variations.



### (p ≤ 0.001): différence très hautement significative entre AgNO<sub>3</sub> et AgNO<sub>3</sub> + Se;  
 + (p ≤ 0.05): différence significative entre AgNO<sub>3</sub> + Se et AgNO<sub>3</sub> + Vit E + Se



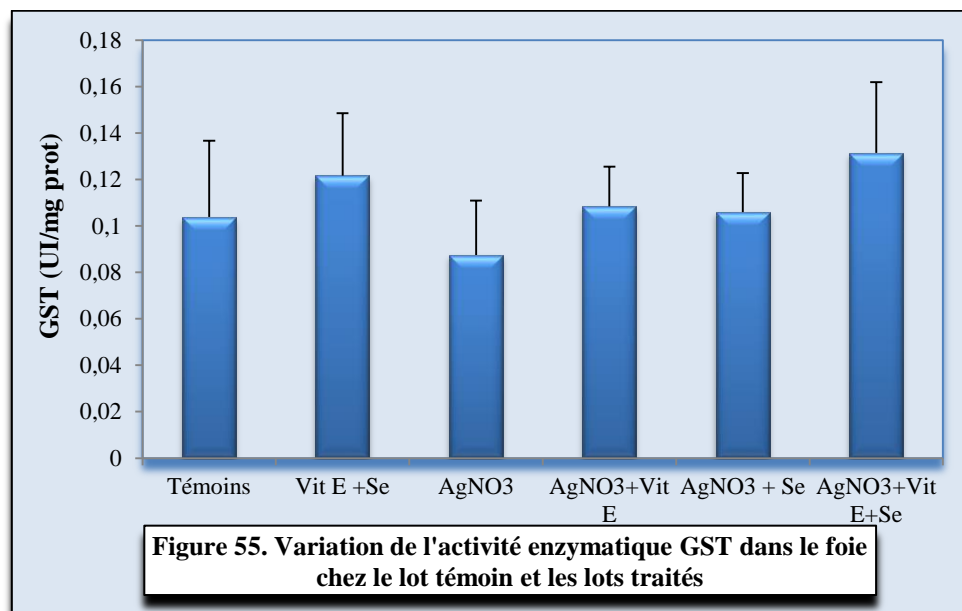
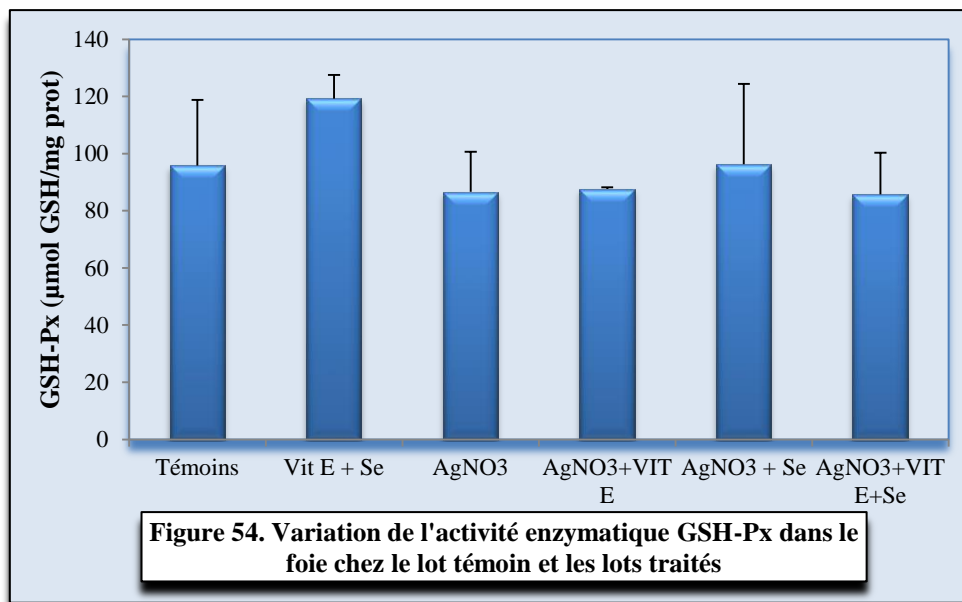
\*\* (p ≤ 0.01): différence hautement significative entre AgNO<sub>3</sub> et témoins;  
 ## (p ≤ 0.01): différence hautement significative entre AgNO<sub>3</sub> et AgNO<sub>3</sub> + Se, AgNO<sub>3</sub> + Vit E + Se;  
 ++ (p ≤ 0.01): différence hautement significative entre AgNO<sub>3</sub> + Vit E et AgNO<sub>3</sub> + Vit E + Se

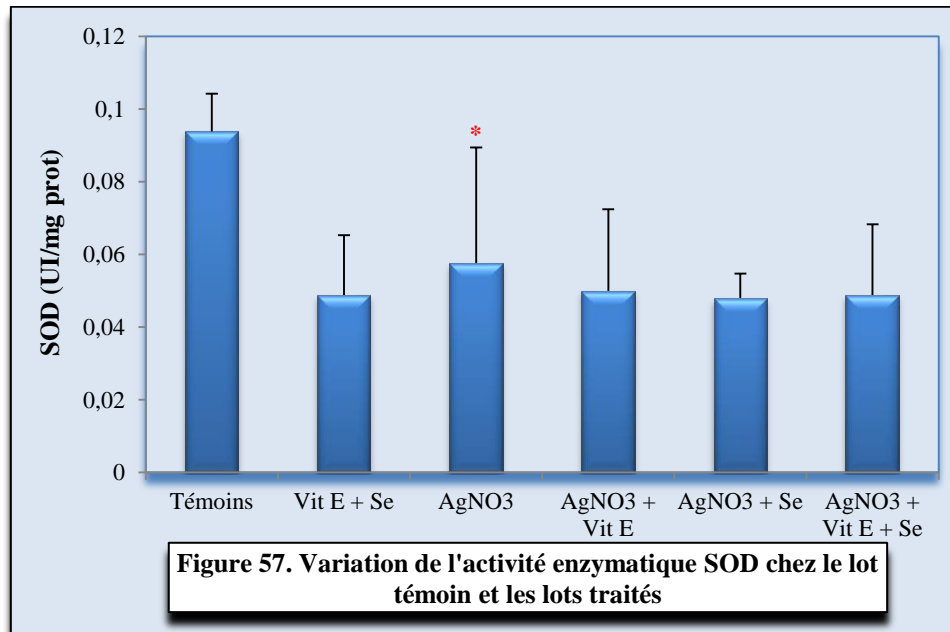
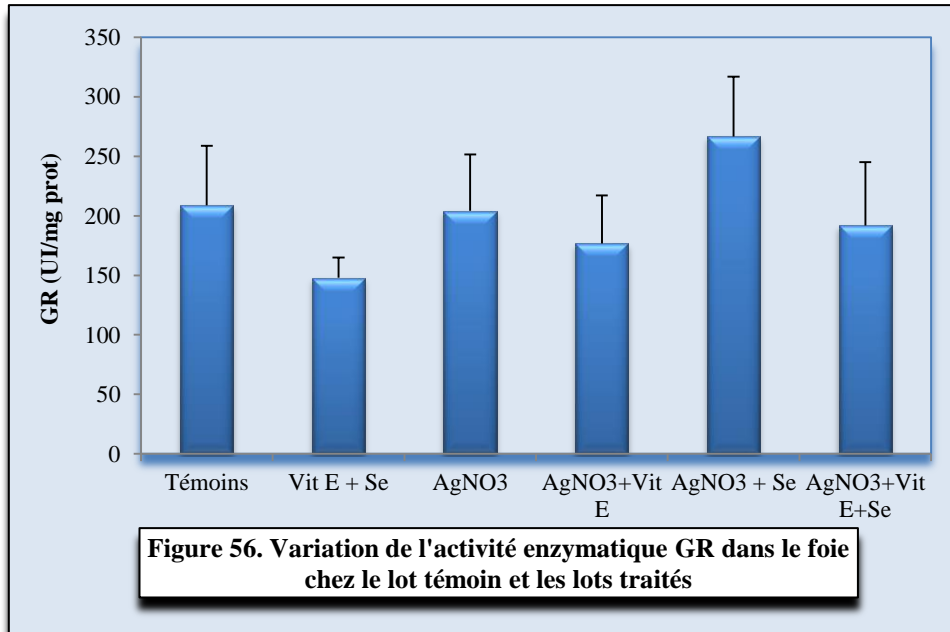
➤ **Les antioxydants enzymatiques**

Les activités enzymatiques GSH-Px, GST et GR hépatiques n'ont montré aucune variation significative sous traitement par Ag ou bien sous les autres traitements.

Par contre, une réduction significative de l'activité enzymatique SOD (p ≤ 0.05) a été notée dans le tissu hépatique des animaux traités par l'argent comparé à celle des témoins.

Les figures 54, 55, 56 et 57 résument les variations des différentes activités enzymatiques obtenues.





\*( $p \leq 0.05$ ): difference significative entre AgNO<sub>3</sub> et témoins

#### **4.1.2. Histopathologie du foie**

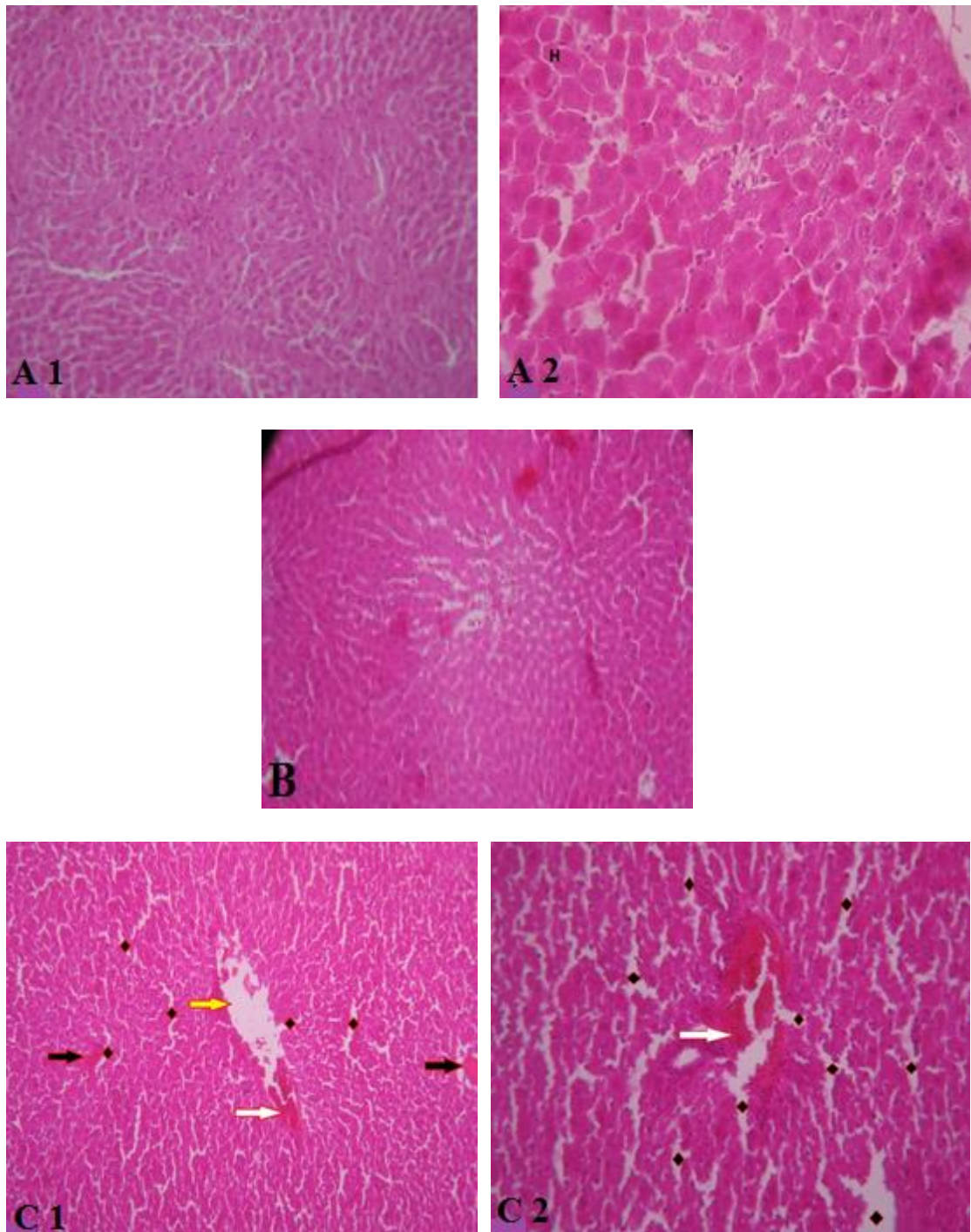
L'examen microscopique après 3 mois des rats témoins et traités seulement par la vitamine E et le sélénium a montré une architecture normale du parenchyme hépatique (figure 58.A1.A2.B).

Néanmoins, l'examen histopathologique du foie des rats traités par l'argent a révélé une absence d'arrangement radiale des hépatocytes avec congestion des vaisseaux, dilatation des sinusoides, accumulation des érythrocytes ainsi qu'une congestion et élargissement des veines portes (figure 58.C1.C2).

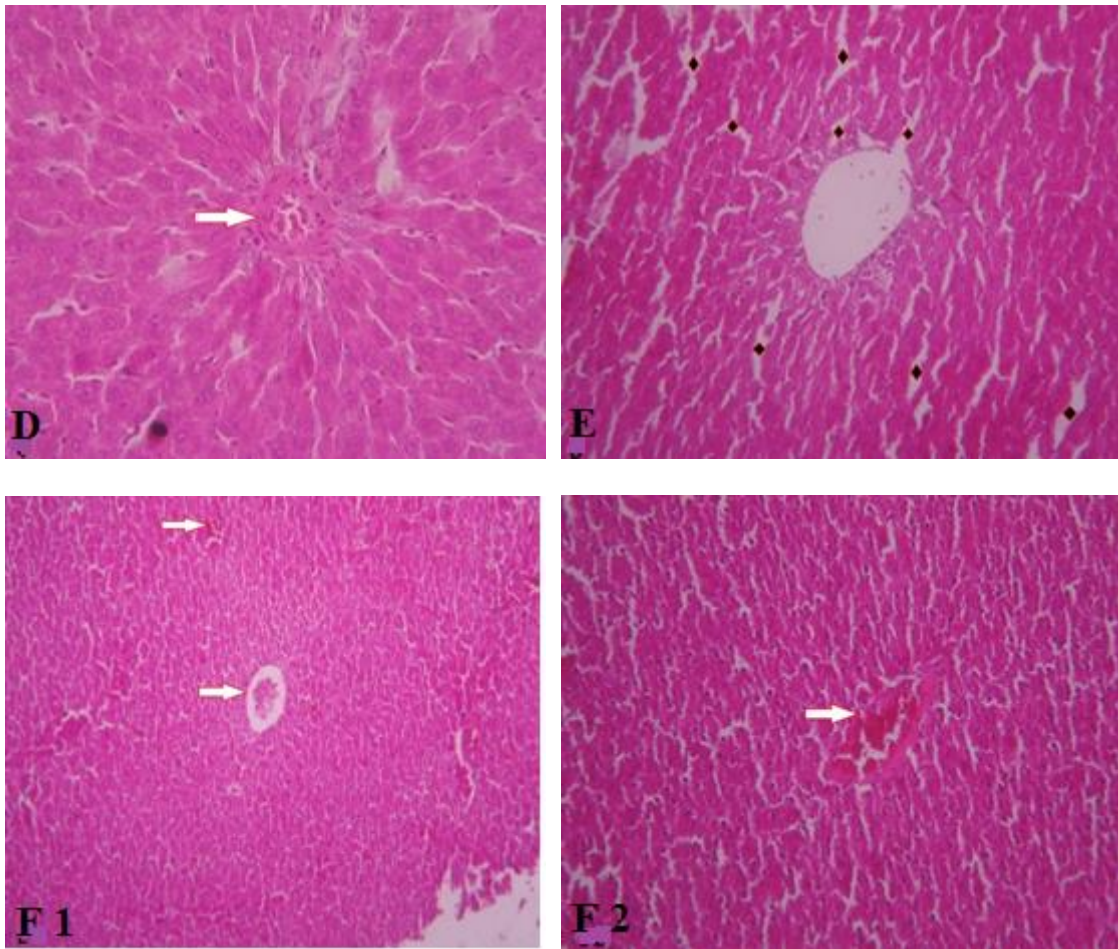
Chez les rats supplémentés par la vitamine E, un arrangement normal des hépatocytes a été remarqué avec espace sinusoidal proche à celui de témoins, mais nous avons remarqué la congestion de veine centre (figure 59.D).

Par contre, la veine centre apparait sans congestion, mais la dilatation des sinusoides et la structure histologique irrégulière sont toujours présentées dans le foie des animaux supplémentés par le sélénium (figure 59.E).

La co-administration de la vitamine E et sélénium a entraîné la restauration de l'histoarchitecture en comparaison avec les rats exposés au métal, à l'exception de l'observation des congestions et accumulation des érythrocytes dans les veines (figure 59.F1.F2).



**Figure 58.** Effet d'argent sur l'histologie du tissu hépatique sous microscope optique. Témoins (A1×250, A2×400), traité par: vitamine E et Se (B×250), traité par Ag (C1×250, C2×400). Coloration éosine hématoxyline. **H**: hepatocytes, ⇨ congestion des veines, ⇨ dilatation des veines, ⇨ congestion des vaisseaux, ◆ dilatation des sinusoids



**Figure 59.** Effet de supplémentation du vitamine E et/ou sélénium sur l’histologie du foie sous microscope optique. Ag + vit E (D×250), Ag + Se (E×250), et Ag + vit E + Se (F1×100, F2×250). Coloration éosine hématoxyline. ⇨ Congestion des veines, ◆ dilatation des sinusoides

## 4.2. Discussion

Le stress oxydant résulte d'un déséquilibre de la balance entre systèmes de défense cellulaires et espèces réactives de l'oxygène en faveur des derniers, cette surproduction des ERO inclus le radical superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ), le radical hydroxyle ( $OH^{\cdot}$ ), le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) et l'oxygène singulet ( $1\Delta gO_2$ ) peut engendrer un certain problème au niveau cellulaire citant des dommages des protéines, d'ADN, et des lipides (Sies, 1991).

De sa part, l'argent apparait affecter le degré de la peroxydation lipidique tissulaire chez le rat. Park *et al.* (2009) ont suggéré que la génération des ERO par l'intermédiaire des ions  $Ag^+$  peut conduire à l'inhibition de l'activité microbienne. De plus, Serafin Munoz *et al.* (2007) ont aussi indiqué que l'argent peut induire des dommages oxydatifs dans *Pleurotus ostreatus*. De même, Rungby (1987) a aussi trouvé que l'argent a causé la peroxydation lipidique au niveau hépatique. Baldi *et al.* (1988) ont montré que l'addition d'argent sous forme d' $AgNO_3$  ou de lactate d'Ag *in vitro* aux hépatocytes isolées est accompagnée par l'élévation de cette oxydation lipidique. Mais ces derniers auteurs ont prouvé qu'il y a un autre mécanisme de cytotoxicité causée par ce métal autre que la génération des radicaux libres, cela est expliqué par l'addition d' $\alpha$ -tocophérol et de déféroxamine qui a prévenu l'accumulation de TBARS au niveau des hépatocytes mais pas la mort de ces dernières par le métal.

Notre présente étude n'a révélé aucune variation significative de la teneur hépatique en TBARS, ce résultat est en accord avec des activités enzymatiques de la glutathion peroxydase, la glutathion-S-transférase et la glutathion réductase inchangées significativement. A l'exception d'une réduction significative de l'activité de superoxyde dismutase. Les antioxydants non enzymatiques ont présenté une élévation considérable concernant la concentration tissulaire en vitamine E. Ces données pourront être expliquées comme suit: le foie étant un organe clé de détoxification, il se caractérise par sa richesse en systèmes de défense tels que les antioxydants dont le système glutathion est le plus abondant pour lutter contre les xénobiotiques les rendant plus solubles et moins actif favorisant donc leur élimination dans les fèces via la bile (Fausto et Campbell, 2003), les métaux lourds sont considérés parmi les xénobiotiques les plus toxiques. D'après plusieurs études, l'argent administré oralement, est transporté par les protéines sériques et déposé principalement au niveau du foie (Kim *et al.*, 2010; Van der Zande *et al.*, 2012). En absence des dommages hépatiques, l'argent est rapidement éliminé par voie biliaire (de 70% à 90% de la dose ingérée dans les 24 heures)

(Fowler et Nordberg, 1986; Eisler, 1996). En cas d'exposition chronique, une accumulation progressive d'argent au niveau hépatique aura lieu, Wijnhoven *et al.* (2009) ont prouvé que

les effets toxiques d'argent sont proportionnels au nombre d'ions libérés qui pourra être associé à la dose de toxique utilisée dans l'expérience.

L'abaissement de l'activité enzymatique SOD hépatique pourra être due à la consommation de cette enzyme dans la conversion d' $O_2^{\cdot-}$  en  $H_2O_2$ . Cela est en corrélation avec l'étude de Park *et al.* (2009) qui ont trouvé que la forme initiale des ERO générée par les ions d'argent est le radical superoxyde, l' $H_2O_2$  n'est pas induit. Similairement, Cortese-Krott *et al.* (2009) ont mentionné que l' $AgNO_3$  a augmenté la production d'anion superoxyde dans la mitochondrie, ce qui pourra être la conséquence des interactions avec les groupements SH des enzymes de la chaîne respiratoire (Almofiti *et al.*, 2003; Park *et al.*, 2009).

L'augmentation de la concentration hépatique en vitamine E est par conséquent suite à la présence des ions d'argent comme le cas des autres métaux lourds citant le cadmium qui a stimulé l'élévation de cette vitamine dans le foie (Zikic *et al.*, 1995; Ognjanovic *et al.*, 2003).

La toxicité du foie est aussi évaluée par l'histopathologie qui a montré l'élargissement et la congestion des veines avec notamment l'accumulation des érythrocytes, la dilatation sinusoïdale et l'arrangement irrégulier des hépatocytes, mais ni inflammation par infiltration leucocytaire ou nécrose / apoptose a été observée. Ces dernières observations sont accentuées par l'étude de Hadrup *et al.* (2012<sup>a</sup>), Kim *et al.* (2010) n'ont pas aussi trouvé aucun signe de lésions hépatiques conduisant à la mort cellulaire mais un état inflammatoire a été noté.

Cependant, l'étude de Kim *et al.* (2009) a trouvé une infiltration lymphocytaire avec destruction des hépatocytes, elle a montré aussi l'accumulation des granules d'argent dans les cellules de Kupffer ainsi que les sinusoïdes.

De sa part, une étude très importante de Sarhan et Hussain (2014) a prouvé en utilisant la microscopie électronique une hypertrophie du nucléole et l'accumulation des globules lipidiques dans le nucléoplasme et le cytoplasme avec une destruction d'un nombre de mitochondrie. Les sinusoïdes hépatiques ont présenté une hypertrophie endothéliale et des cellules de Kupffer. Des granules noirs d'argent sont trouvés déposés dans des endosomes, des lysosomes et dans les cellules Kupffer. Cette accumulation des complexes  $Ag_2S$  pourra être due à la forte affinité aux groupements sulfurés qui sont fréquemment présents dans le foie (Van Der Zande *et al.*, 2012).

Toutefois, la vitamine E a réduit la peroxydation lipidique et le sélénium a amélioré la teneur hépatique en GSH. La vitamine E est un antioxydant liposoluble qui entre en interaction directement avec une variété de radicaux libres compris le radical superoxyde (Weiyang *et al.*, 2009). Une quantité importante de cette vitamine est stockée dans le foie (Feki *et al.*, 2001).

Le traitement par l' $\alpha$ -tocophérol apparait diminuer la teneur hépatique en TBARS. Les mêmes résultats sont obtenus par Djurasevic *et al.* (2010). Certes, le mitochondrie est considéré comme la source principale d'anions superoxyde chez les eucaryotes et la vitamine E est reconnue par son accumulation dans les membranes mitochondriales internes (Ibrahim *et al.*, 2000) en les protégeant contre le stress oxydatif pouvant atteindre la chaîne respiratoire (Ham et Liebler, 1995). Selon ce point de vue, la diminution de la SOD après traitement par les antioxydants a indiqué que la supplémentation en antioxydants a amélioré la défense mitochondriale antioxydante (Djurasevic *et al.*, 2010).

De plus, le sélénium est un constituant essentiel du site actif de la glutathion peroxydase sous forme de sélénocystéine, cette enzyme catalyse la dégradation de peroxyde d'hydrogène et des hydroperoxydes organiques (Gouttebel *et al.*, 1986).

Selon plusieurs investigations, une alimentation pauvre en vitamine E et sélénium peut être la cause d'un certain nombre de lésions inclus l'hémolyse des érythrocytes, la myodégénération, nécrose hépatique, dégénération rénale, les gastro-entérites à éosinophiles chez les rats dépendant de degré de déficience (Hong et Chow, 1988; Chow, 1990; Gouttebel *et al.*, 1996).

La relation fonctionnelle entre la vitamine E et le sélénium a été reconnu depuis longtemps, elle pourra être expliquée par le rôle important de ces deux nutriments dans le contrôle de processus oxydatif (Borek *et al.*, 1986). Ils ont apparu donc comme des défenseurs des cellules contre les métaux lourds et précisément l'argent, pour cette raison des études ont prouvé le remplacement de soufre par le sélénium dans les granules  $Ag_2S$  en les transformant en  $Ag_2Se$  ou séléniure d'argent sous lesquels se précipite le métal dans le foie, cette remplacement pourra être donc la cause d'augmentation considérable du taux de glutathion hépatique par libération des groupement thiols participés ainsi dans la formation de celui-ci (EPA, 1980; Eisler, 1996). Le sélénium augmente donc l'accumulation d'argent dans le foie en atténuant ces effets oxydants, cela est considéré par les investigateurs comme un moyen de détoxification mais l' $\alpha$ -tocophérol n'est pas caractérisé par cette propriété (Black *et al.*, 1980; Ridlington et Whanger, 1981; Draper, 1985).

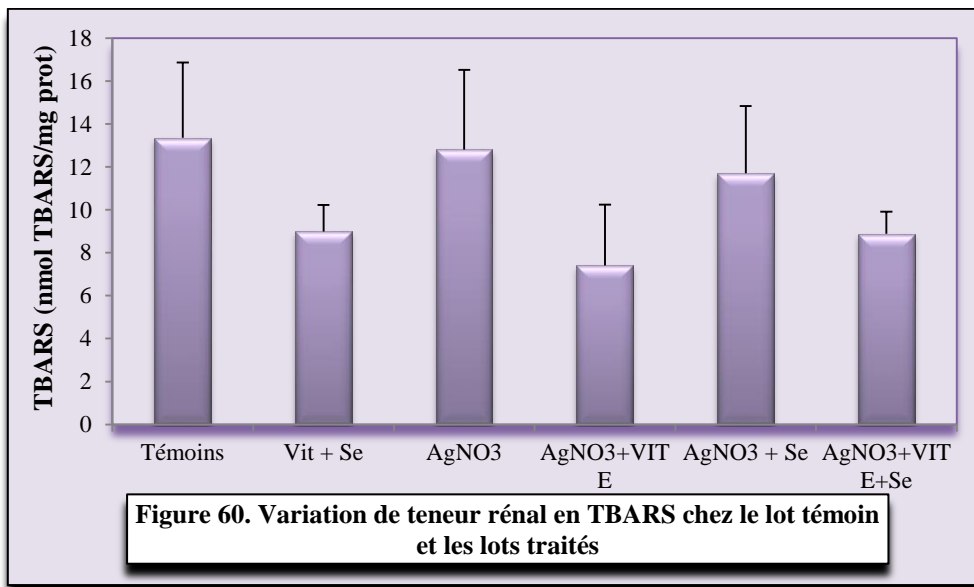
**5. Effet d'argent sur le tissu rénal et évaluation du traitement par la vitamine E et le sélénium**

**5.1. Résultats**

**5.1.1. Marqueurs biologiques du stress oxydant**

➤ **La peroxydation lipidique**

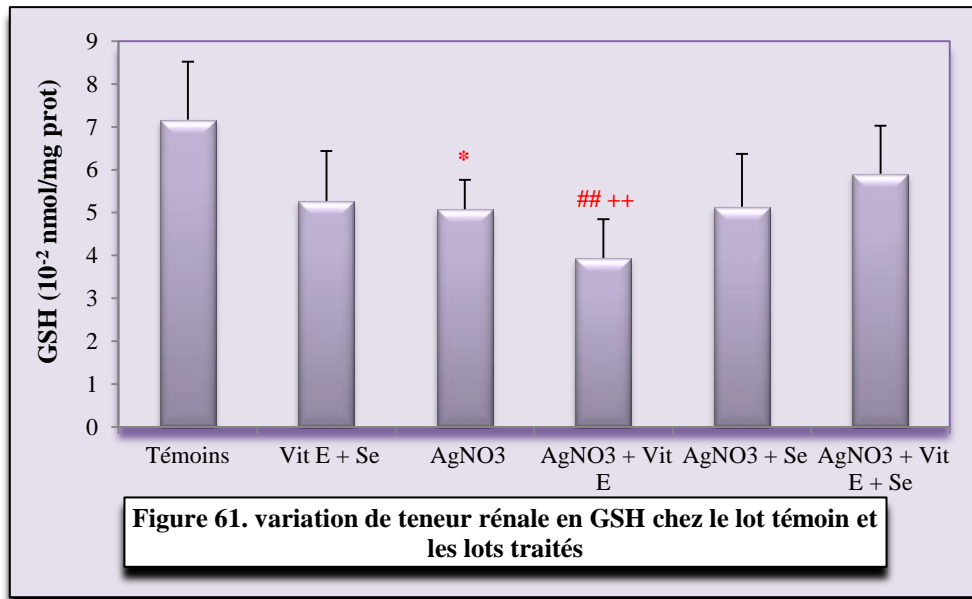
Semblablement, la peroxydation lipidique au niveau rénal n'a détecté aucun changement significatif sous l'influence de métal, une réduction par les antioxydants mais aussi non significative a été notée (figure 60).



➤ **Les antioxydants non enzymatiques**

L'argent a causé la réduction significative ( $p \leq 0.05$ ) du GSH rénal comparé à ceux de témoins, on constate aussi à une diminution après supplémentation de la vitamine E ( $p \leq 0.01$ : AgNO<sub>3</sub>, AgNO<sub>3</sub> + Vit E + Se). Différemment, l' $\alpha$ -tocophérol dans les reins a reconnu un abaissement mais aucune signification chez le lot AgNO<sub>3</sub> et les lots supplémentés.

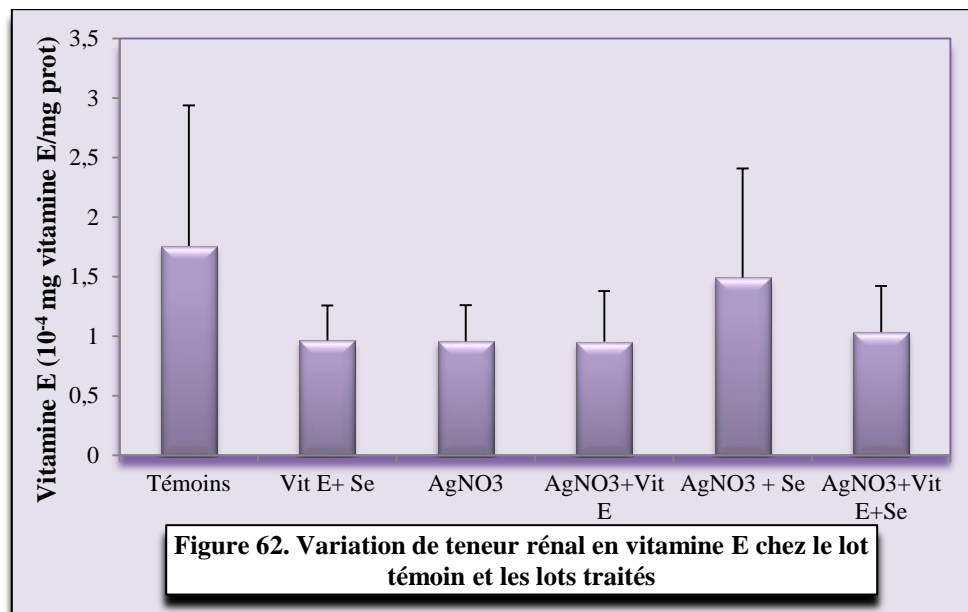
Les valeurs obtenues sont détaillées dans les 2 figures ci-dessous.



\* (p ≤ 0.05): différence significative entre AgNO<sub>3</sub> et témoins;

## (p ≤ 0.01): différence hautement significative entre AgNO<sub>3</sub> et AgNO<sub>3</sub> + Vit E;

++ (p ≤ 0.01): différence hautement significative entre AgNO<sub>3</sub> + Vit E et AgNO<sub>3</sub> + Vit E + Se



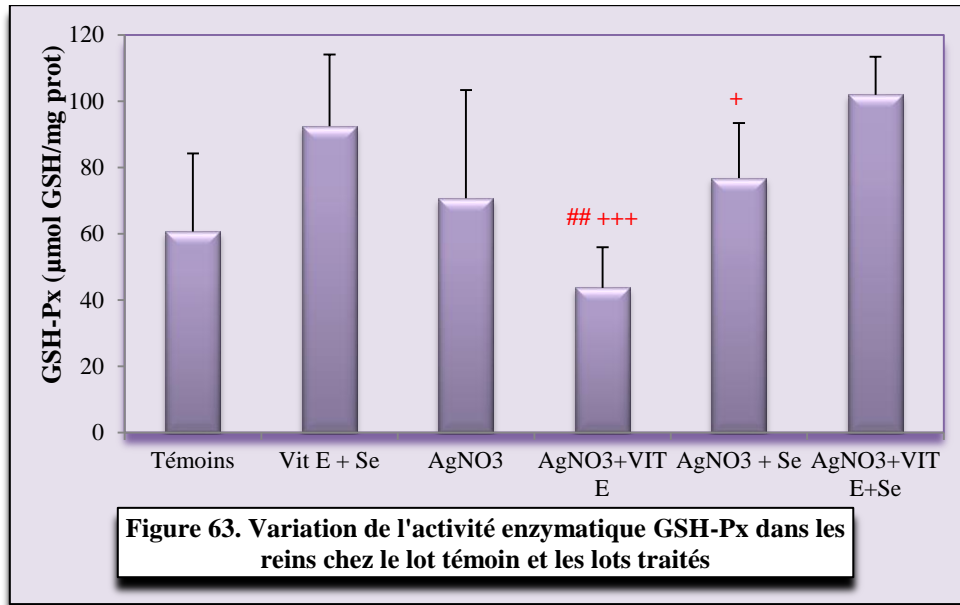
➤ **Les antioxydants enzymatiques**

Similairement au foie, le métal n’a révélé aucune altération sur l’activité du glutathion peroxydase au niveau rénal, mais on assiste à une réduction suite à la supplémentation par la vitamine E (p ≤ 0.01: AgNO<sub>3</sub>), la supplémentation par les deux antioxydants simultanément a donné une augmentation notable de cette activité (p ≤ 0.05: AgNO<sub>3</sub> + Se , p ≤ 0.001: AgNO<sub>3</sub> + Vit E). De sa part, l’activité enzymatique GST n’a pas été influencée par l’argent, mais les 2 lots AgNO<sub>3</sub> + Se et AgNO<sub>3</sub> + Vit E + Se ont présenté une diminution notable (p ≤ 0.01) et (p ≤ 0.05) par rapport au lot AgNO<sub>3</sub> respectivement.

De même, l'activité GR n'a pas été altérée par le métal, elle a réduit en présence d'antioxydants au niveau rénal ( $\text{AgNO}_3 + \text{Vit E}$ :  $p \leq 0.01$ ), ( $\text{AgNO}_3 + \text{Se}$ :  $p \leq 0.05$ ) et ( $\text{AgNO}_3 + \text{Vit E} + \text{Se}$ :  $p \leq 0.01$ ) par rapport au lot  $\text{AgNO}_3$ .

La SOD rénale a resté sans modification significative suite aux différents traitements.

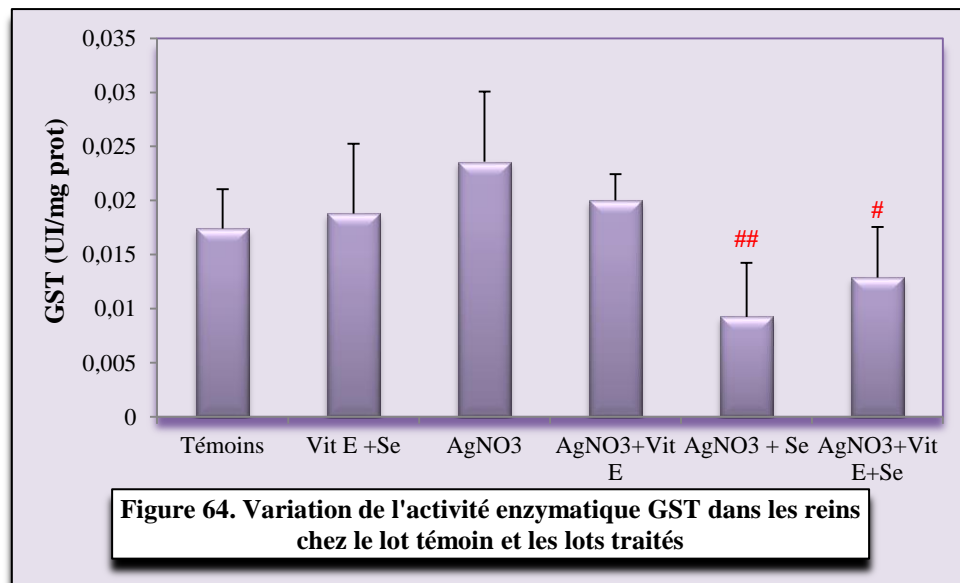
Les valeurs obtenues sont présentées aux figures ci-dessous.



### ( $p \leq 0.01$ ): différence hautement significative entre  $\text{AgNO}_3$  et  $\text{AgNO}_3 + \text{Vit E} + \text{Se}$ ;

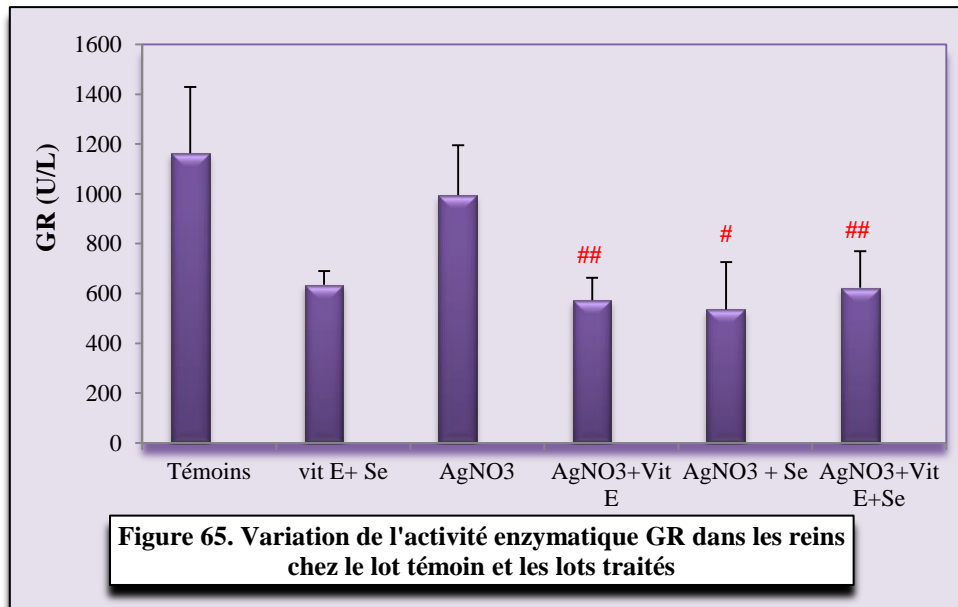
+ ( $p \leq 0.05$ ): différence significative entre  $\text{AgNO}_3 + \text{Se}$  et  $\text{AgNO}_3 + \text{Vit E} + \text{Se}$ ;

+++ ( $p \leq 0.001$ ): différence très hautement significative entre  $\text{AgNO}_3 + \text{Vit E}$  et  $\text{AgNO}_3 + \text{Vit E} + \text{Se}$



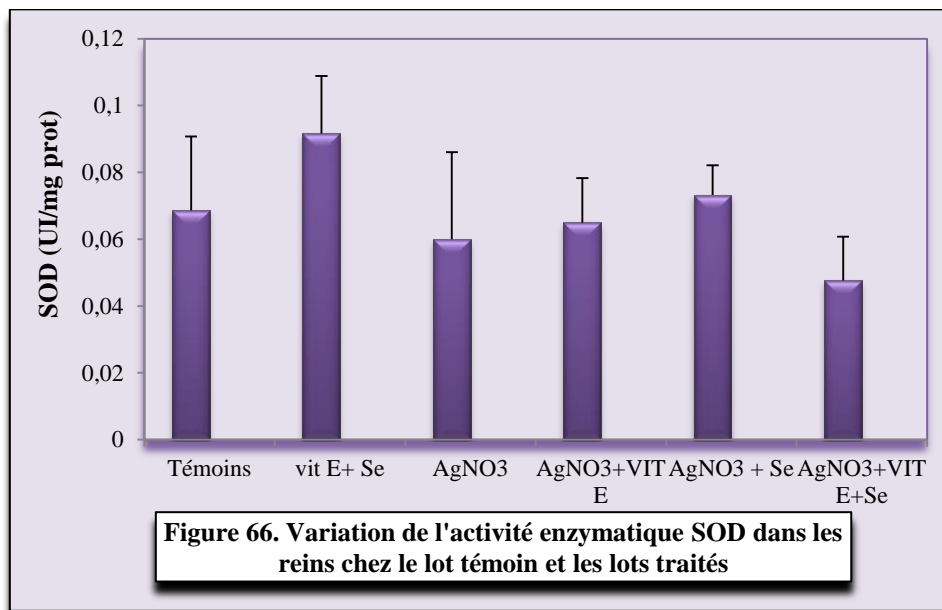
# ( $p \leq 0.05$ ): différence significative entre  $\text{AgNO}_3$  et  $\text{AgNO}_3 + \text{Vit E} + \text{Se}$ ;

## ( $p \leq 0.01$ ): différence hautement significative entre  $\text{AgNO}_3$  et  $\text{AgNO}_3 + \text{Se}$



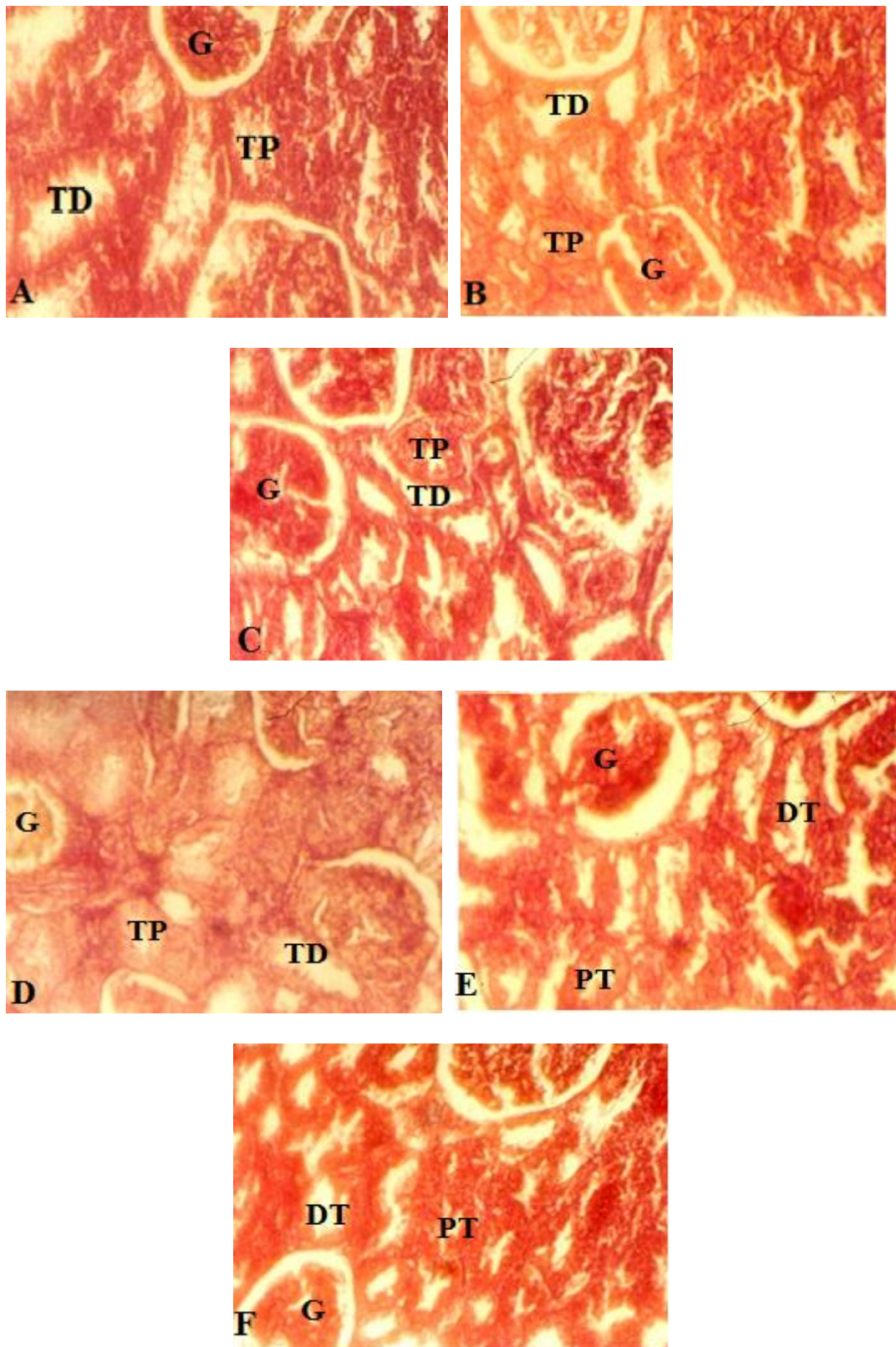
# ( $p \leq 0.05$ ): différence significative entre AgNO<sub>3</sub> et AgNO<sub>3</sub> + Se;

## ( $p \leq 0.01$ ): différence hautement significative entre AgNO<sub>3</sub> et AgNO<sub>3</sub> + Vit E, AgNO<sub>3</sub> + Vit E + Se



### 5.1.2. Histopathologie du rein

L'examen histopathologique du cortex rénal des rats témoins et le lot Vit E + Se a révélé une architecture tissulaire normale bien définie: glomérules entourés par la capsule de Bowman, tubules proximaux et distaux. Cette histoarchitecture reste intacte après traitement par l'argent, nous n'avons pas remarqué des troubles affectant ce tissu. De même, les lots supplémentés n'ont présenté aucun changement notable. La figure 67 illustre l'histologie des différents lots.



**Figure 67.** Effet d'argent et de supplémentation du vitamine E et/ou sélénium sur l'histologie des reins sous microscope optique. Témoins (A), Vit + Se (B), Ag (C), Ag + vit E (D), Ag +Se (E) et Ag + vit E + Se (F). Coloration éosine hématoxyline (×40). **G:** glomérule, **TD:** tubule distal, **TP:** tubule proximal

## 5.2. Discussion

La peroxydation lipidique au niveau rénal n'a pas été influée en présence de métal, à leurs tours, les activités enzymatiques des antioxydants et la teneur en vitamine E n'ont pas variés significativement à l'exception de la réduction remarquable en GSH.

L'étude de Rungby (1987) est en corrélation avec nos résultats montrant que l'argent n'a pas induit la génération des radicaux libres au niveau rénal. Les reins constituent après le foie un organe dont le rôle détoxifiant est crucial, 10 à 25% du métal non retenu par l'organisme est excrété via les urines (Fowler et Nordberg, 1986; Eisler, 1996).

Le GSH est un antioxydant puissant protégeant les systèmes biologiques contre les éléments chimiques pouvant induire des dommages oxydatifs (Nicotera et Orrenius, 1986). Ce tripeptide réagit comme un donneur d'électron dans les systèmes enzymatiques, en éliminant les radicaux libres. Cependant, le GSH peut réagir rapidement et spontanément sans intervention enzymatique avec le radical hydroxyl, l'oxyde d'azote (III) et le peroxy-nitrite. De plus, il est aussi intervenue dans la détoxification d'un certain nombre de métaux lourds par la formation des complexes S-conjugués avec les métabolites toxiques au cours de biotransformation, le GSH forme aussi des complexes S-conjugués avec les produits de la peroxydation lipidique. La complexation de cet antioxydant avec les métaux lourds pourra être formée suivant des réactions non enzymatiques. Le GSH est l'un des ligands essentiels jouant un rôle vital dans le transport, le stockage, et le métabolisme des métaux

En outre, la diminution de GSH ne dépend pas seulement à son utilisation dans les réactions redox ou de désordres de sa régénération mais aussi aux problèmes liées à sa synthèse (Jurczuk *et al.*, 2006).

D'après Cortese-Krott *et al.* (2009), la diminution de GSH pourra être causée par la réaction des ions  $Ag^+$  avec le groupement thiol de glutathion ou par l'augmentation de son exportation au cours de son consommation en dehors de la cellule.

La supplémentation de la vitamine E apparait diminuer cette teneur en GSH, ainsi que l'activité enzymatique GSH-Px et GR. Cette réduction pourra être expliquée comme suit: l' $\alpha$ -tocophérol est réagi comme donneur d'un atome d'hydrogène réactif dans la position C6 aux radicaux d'oxygène formant le radical tocophéryl. Ce radical doit être recyclé en  $\alpha$ -tocophérol par interaction des antioxydants hydrosolubles tels la vitamine C ou irréversiblement oxydé en  $\alpha$ -tocophérylquinone, ce dernier est excrété par réaction avec le GSH formant l'hydroquinone (Sachdeva *et al.*, 2005; Memisogullari *et al.*, 2006). Certainement, le processus anti-radicalaire engendré par la vitamine E peut entraver la génération des hydroperoxydes entraînant donc l'abaissement de l'activité GSH-Px et par conséquent la

diminution de produit de la réaction qui est le glutathion oxydé, qui est lui-même un substrat pour la glutathion réductase entraînant ainsi une chute de son activité.

Cependant, l'ajout de sélénium a fait augmenter l'activité GSH-Px d'où son intervention dans la composition de son site actif, avec réduction de l'activité GR ce qui est en accord avec l'étude de Sochor *et al.* (2012) qui ont trouvé que le sélénium sous plusieurs formes chimiques a causé une telle réduction. De même, un abaissement de l'activité GST pourra due à l'interaction sélénium et argent observée aussi dans les reins, les deux éléments exercent un effet antagoniste l'un contre l'autre par augmentation de la précipitation des granules Ag<sub>2</sub>Se se traduisant par une activité moins importante de GST (Drapper, 1985). Cette enzyme assure la catalyse des réactions de conjugaison des substances toxiques et le GSH contribuant donc à un processus de détoxification (Jurczuk *et al.*, 2006).

De même, l'étude histologique qui n'a pas présenté aucune nécrose ou autres dommages tissulaires est en accord avec le bilan rénal et les paramètres du stress oxydatif présentant aussi aucuns troubles.

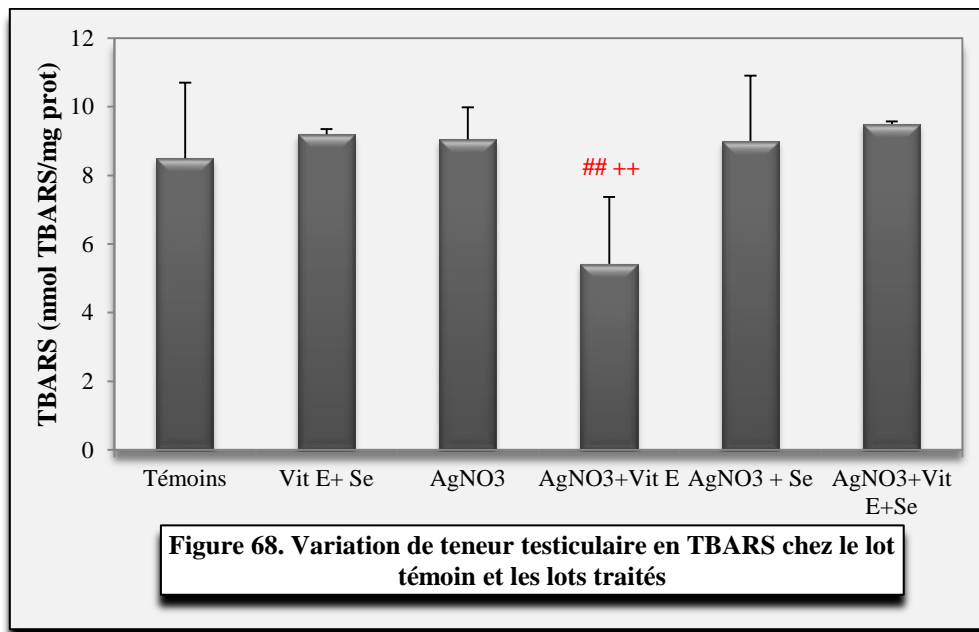
**6. Effet d'argent sur le tissu testiculaire et évaluation du traitement par la vitamine E et le sélénium**

**6.1. Résultats**

**6.1.1. Marqueurs biologiques du stress oxydant**

➤ **La peroxydation lipidique**

La concentration tissulaire en TBARS a reconnu un changement notable seulement chez le lot supplémenté par la vitamine E ( $p \leq 0.01$ : AgNO<sub>3</sub>,  $p \leq 0.01$ : AgNO<sub>3</sub> + vit E + Se) comme le montre la figure 68.

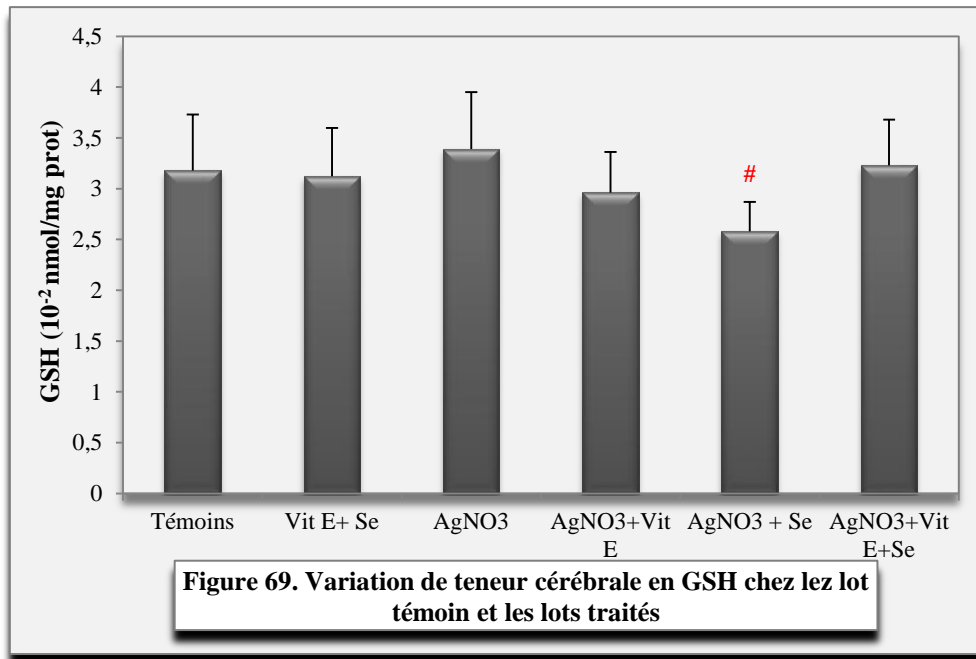


## ( $p \leq 0.01$ ): différence hautement significative entre AgNO<sub>3</sub> et AgNO<sub>3</sub> + Vit E;

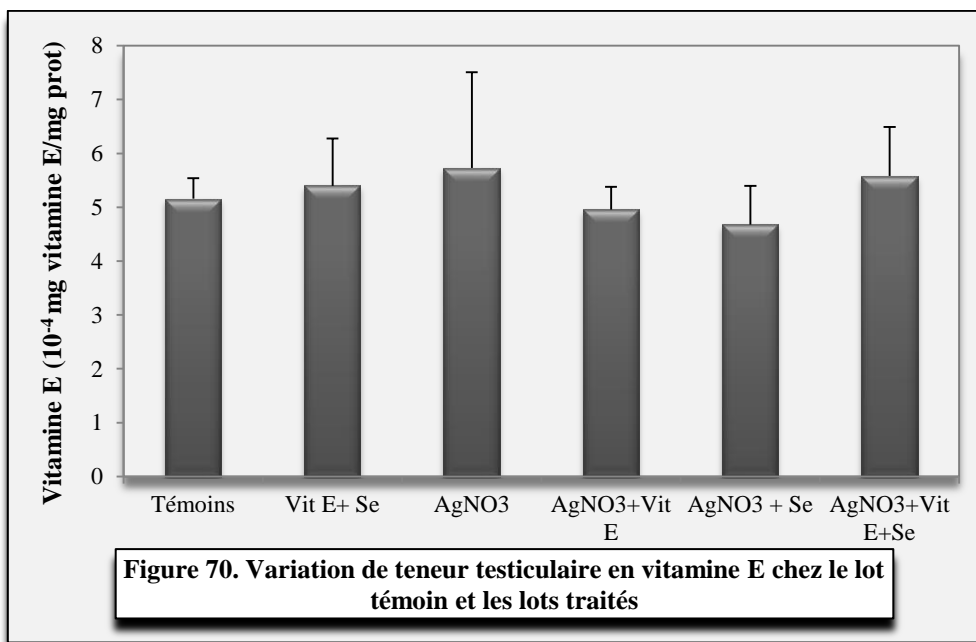
++ ( $p \leq 0.01$ ): différence hautement significative entre AgNO<sub>3</sub> + Vit E et AgNO<sub>3</sub> + Vit E + Se

➤ **Les antioxydants non enzymatiques**

Le GSH ainsi que la vitamine E testiculaires n'ont pas été influés suite au traitement par l'argent, la seule différence significative du GSH est notée chez les rats supplémentés par le sélénium ( $p \leq 0.05$ : AgNO<sub>3</sub>) (figures 69 et 70).



<sup>#</sup>(p ≤ 0.05): différence significative entre AgNO<sub>3</sub> et AgNO<sub>3</sub> + Se



➤ **Les antioxydants enzymatiques**

Dans les testicules, nous n'avons pas remarqué le changement significatif de l'activité GSH-Px sous traitement par l'argent, mais cette activité a été élevée significativement comme suit: chez le lot AgNO<sub>3</sub> + Se (p ≤ 0.001: AgNO<sub>3</sub>), chez le lot AgNO<sub>3</sub> + vit E + Se (p ≤ 0.001: AgNO<sub>3</sub>, p ≤ 0.01: AgNO<sub>3</sub> + vit E, AgNO<sub>3</sub> + Se).

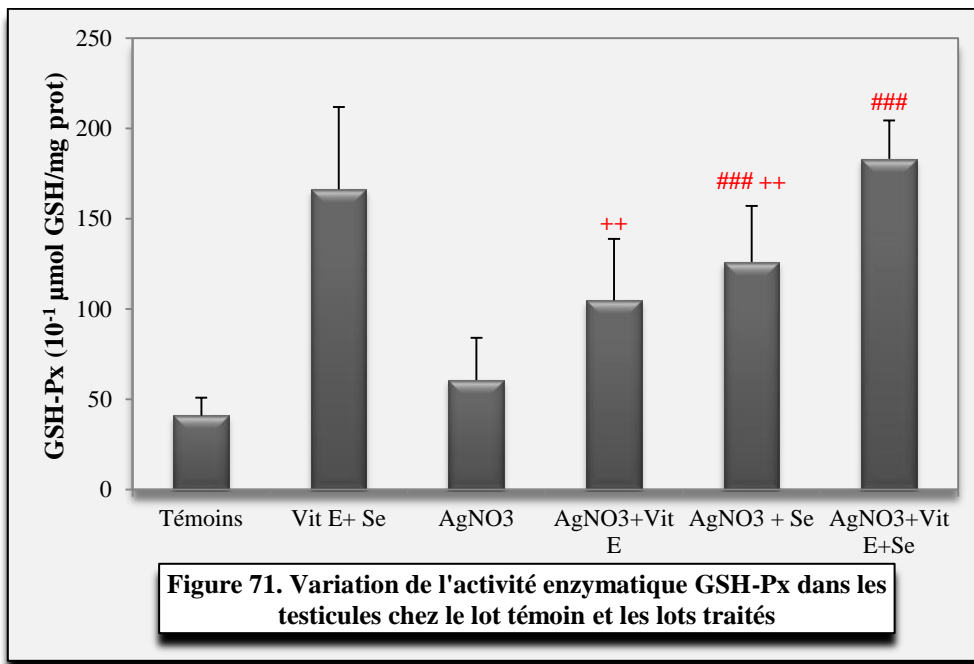
Contrairement, l'activité GST a été augmentée en présence seulement d'argent (p ≤ 0.01), pourtant que cette activité a connu une réduction chez les lots suivants: le lot AgNO<sub>3</sub> + Se

( $p \leq 0.05$ :  $\text{AgNO}_3$ ), le lot  $\text{AgNO}_3 + \text{vit E} + \text{Se}$  ( $p \leq 0.01$ :  $\text{AgNO}_3$  et  $\text{AgNO}_3 + \text{vit E}$ ,  $p \leq 0.05$ :  $\text{AgNO}_3 + \text{Se}$ ).

De même, la GR testiculaire a été affectée par l'argent signalons une diminution très hautement significative ( $p \leq 0.001$ ) comparé aux témoins, la vitamine E a augmenté cette activité ( $p \leq 0.05$ :  $\text{AgNO}_3 + \text{vit E} + \text{Se}$ ).

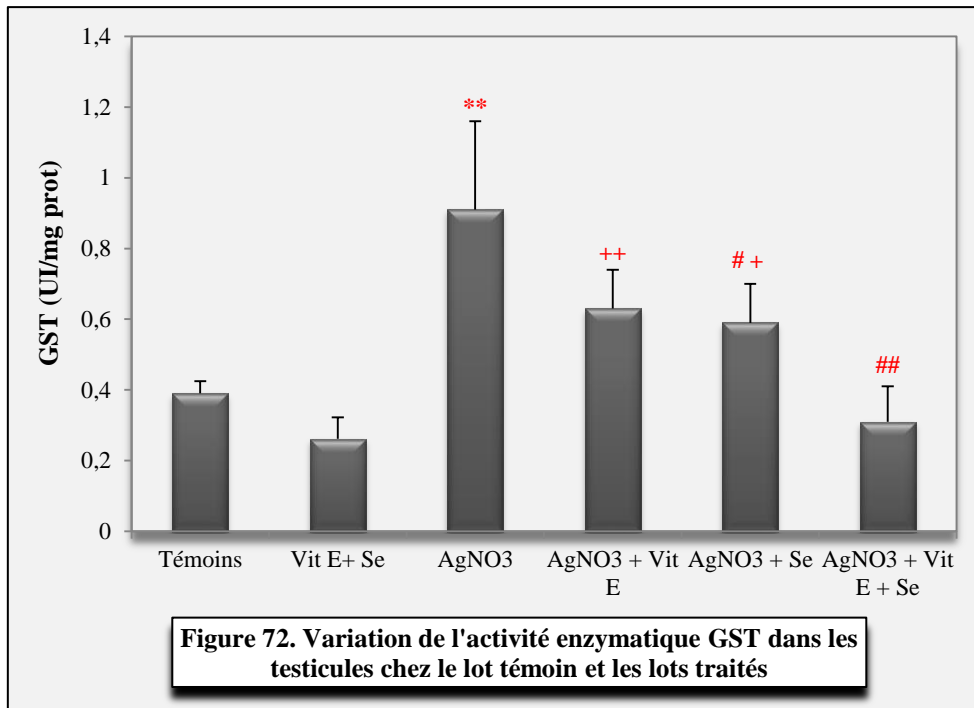
Aucune différence significative entre les cinq lots n'a été enregistrée concernant l'activité enzymatique SOD et CAT.

Ces différentes valeurs sont illustrées dans les figures ci-dessous.



### ( $p \leq 0.001$ ): différence très hautement significative entre  $\text{AgNO}_3$  et  $\text{AgNO}_3 + \text{Se}$ ,  $\text{AgNO}_3 + \text{Vit E} + \text{Se}$ ;

++ ( $p \leq 0.01$ ): différence hautement significative entre  $\text{AgNO}_3 + \text{Vit E}$ ,  $\text{AgNO}_3 + \text{Se}$  et  $\text{AgNO}_3 + \text{Vit E} + \text{Se}$



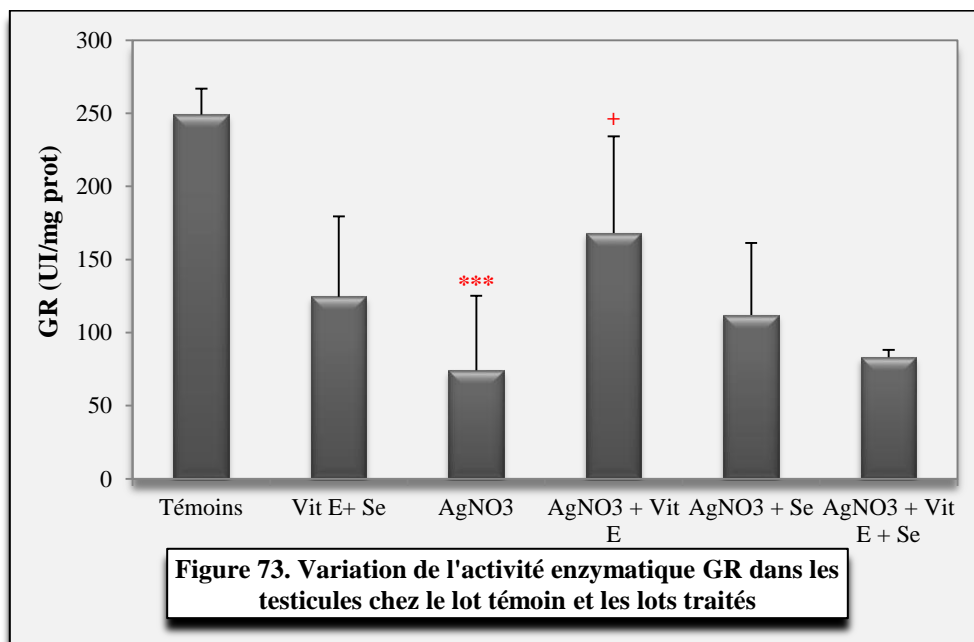
\*\* ( $p \leq 0.01$ ): différence hautement significative entre AgNO<sub>3</sub> et témoins;

# ( $p \leq 0.05$ ): différence significative entre AgNO<sub>3</sub> et AgNO<sub>3</sub> + Se;

## ( $p \leq 0.01$ ): différence hautement significative entre AgNO<sub>3</sub> et AgNO<sub>3</sub> + Vit E + Se;

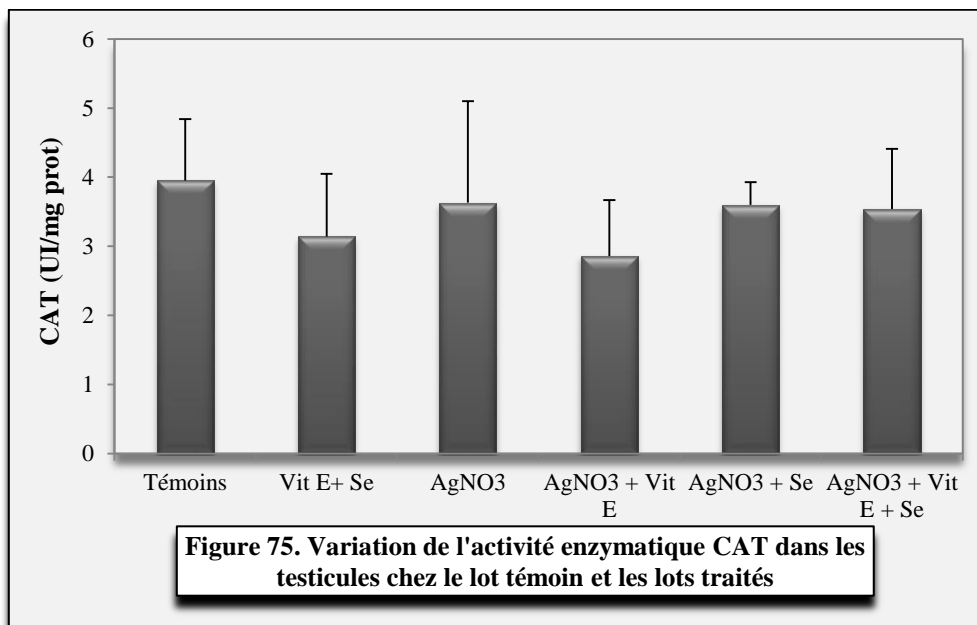
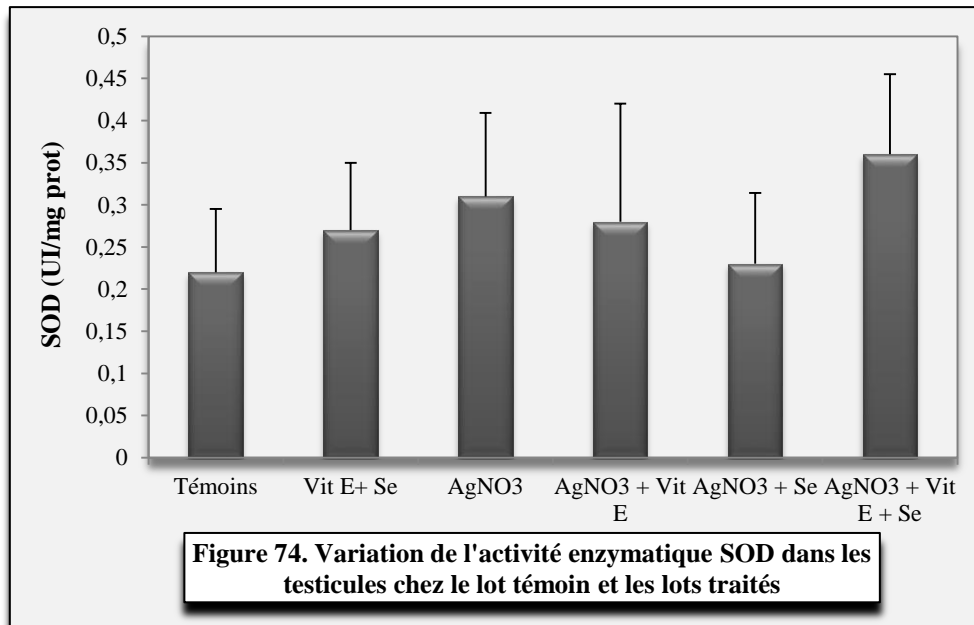
+ ( $p \leq 0.05$ ): différence significative entre AgNO<sub>3</sub> + Se et AgNO<sub>3</sub> + Vit E + Se;

++ ( $p \leq 0.01$ ): différence hautement significative entre AgNO<sub>3</sub> + Vit E et AgNO<sub>3</sub> + Vit E + Se



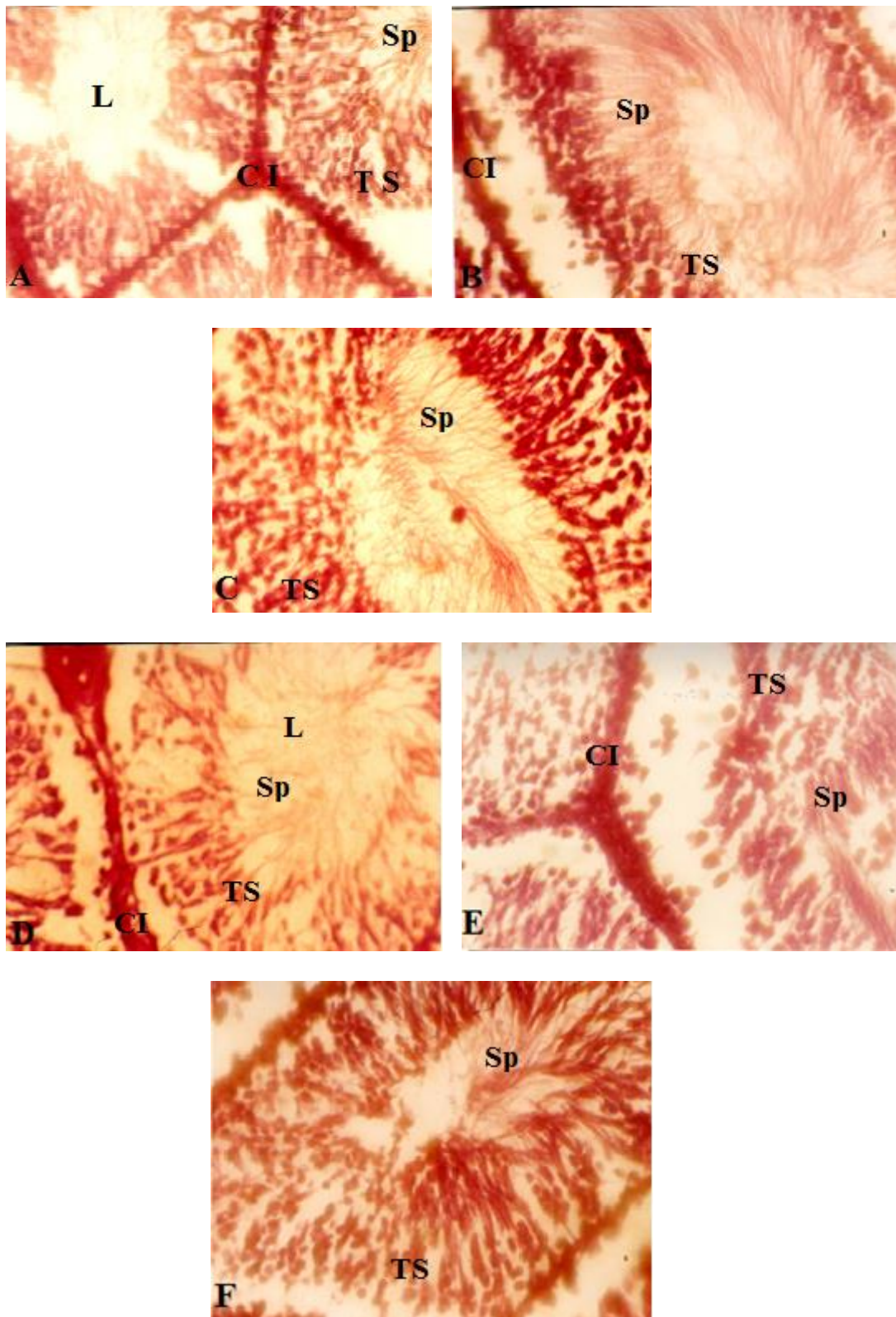
\*\*\* ( $p \leq 0.001$ ): différence très hautement significative entre AgNO<sub>3</sub> et témoins;

+ ( $p \leq 0.05$ ): différence significative entre AgNO<sub>3</sub> + Vit E et AgNO<sub>3</sub> + Vit E + Se



**6.1.2. Histopathologie du testicule**

Les testicules apparaissent histologiquement sans dommages notables au niveau tissulaire chez les animaux traités par l'argent par rapport aux témoins et aux autres traitements.



**Figure 76.** Effet d'argent et de supplémentation du vitamine E et/ou sélénium sur l'histologie des testicules sous microscope optique. Témoins (A), Vit + Se (B), Ag (C), Ag + vit E (D), Ag + Se (E) et Ag + vit E + Se (F). Coloration éosine hématoxyline (×40). **CI**: cellules interstitielles, **L**: lumière de tube séminifère, **Sp**: spermatozoïdes, **TS**: tube séminifère

## 6.2. Discussion

Au niveau des testicules, l'argent n'a pas changé significativement le taux tissulaire en TBARS, le GSH, la vitamine E, l'activité enzymatique de la GSH-Px, la SOD et la CAT. Mais, on contribue à une augmentation et une diminution considérables des deux activités GST et GR respectivement.

Les testicules sont parmi les organes cibles d'argent, de récentes études ont prouvé sa distribution au niveau testiculaire après une exposition orale subchronique (Kim *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2010). Van Der Zande *et al.* (2012) ont trouvé que l'élimination d'argent par les testicules est extrêmement lente du fait qu'ils contiennent de fortes concentrations même après deux mois de l'exposition finale, on peut mettre en liaison ces données avec nos résultats montrant une élévation de la GST après trois mois de traitement. Comme les métallothionéines, l'induction de la GST pourra être causée par les métaux lourds tels que l'argent (Jurczuk *et al.*, 2006). Nous avons aussi contribué à une chute de l'activité GR, un tel abaissement n'est pas seulement lié au GSSG mais aussi à un déficit de NADPH. La glucose-6-phosphate déshydrogénase est responsable du maintien de NADPH, l'activité de cette enzyme pourra être altérée par différents toxiques citant l'argent (Jurczuk *et al.*, 2006).

L'étude histologique n'a exhibé aucunes déformations ou mort cellulaire au sein du tissu testiculaire chez les animaux traités par le métal, les mêmes remarques ont été mentionnées par Miresmaeili *et al.* (2013) notant des tubes séminifères et des cellules de Leydig intacts après exposition des rats aux nanoparticules d'argent, mais ils ont remarqués une réduction des spermatides et des spermatozoïdes.

Pareillement aux autres organes, les antioxydants exercent des effets bénéfiques sur le statut oxydant de la cellule, la vitamine E apparait toujours abaisser le taux des TBARS, de même, le sélénium seul ou en combinaison avec l' $\alpha$ -tocophérol semble améliorer l'activité GSH-Px, cela pourra être en accord avec la diminution de GSH chez le lot  $\text{AgNO}_3 + \text{Se}$  par rapport au lot  $\text{AgNO}_3$  due à sa consommation comme substrat de cette enzyme, de plus, la présence de cet élément fait normaliser l'activité GST en entraînant sa réduction par rapport à celle des rats traités par Ag. De sa part, la vitamine E est trouvée améliorer l'activité GR.

Toutes ses observations sont déjà discutées préalablement.

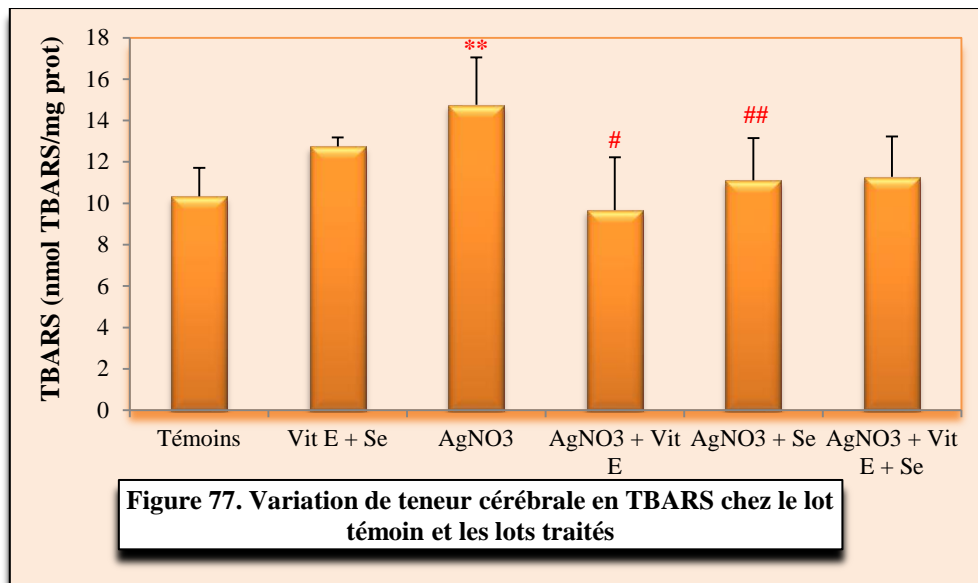
**7. Evaluation de la neurotoxicité induite par l'argent et effet protecteur de la vitamine E et du sélénium**

**7.1. Résultats**

**7.1.2. Marqueurs biologiques du stress oxydant**

➤ **La peroxydation lipidique**

Différemment aux autres organes, on assiste à une augmentation hautement significative ( $p \leq 0.01$ ) du TBARS chez le tissu cérébral des animaux intoxiqués par le métal comparés aux témoins, cette valeur a diminué ensuite suite au traitement par la vitamine E ( $p \leq 0.05$ ) et par le sélénium ( $p \leq 0.01$ ) comparés au lot  $AgNO_3$  (figure 77).



**Figure 77. Variation de teneur cérébrale en TBARS chez le lot témoin et les lots traités**

\*\* ( $p \leq 0.01$ ): différence hautement significative entre  $AgNO_3$  et témoins;  
 # ( $p \leq 0.05$ ): différence significative entre  $AgNO_3$  et  $AgNO_3 + Vit E$ ;  
 ## ( $p \leq 0.01$ ): différence hautement significative entre  $AgNO_3$  et  $AgNO_3 + Se$

➤ **Les antioxydants non enzymatiques**

Le GSH cérébral des rats est inchangé significativement dans le cerveau des rats traités par Ag et celui des rats traités par chacun des deux antioxydants, l'augmentation remarquable a caractérisé le lot supplémenté par la vitamine E et le sélénium en combinaison ( $p \leq 0.05$ :  $AgNO_3$ ,  $p \leq 0.001$ :  $AgNO_3 + Se$ ).

De même que le foie, la concentration cérébrale en vitamine E est augmentée d'une façon hautement significative ( $p \leq 0.01$ ) chez le lot  $AgNO_3$  par rapport aux témoins.

Les figures ci-dessous illustrent les valeurs obtenues.

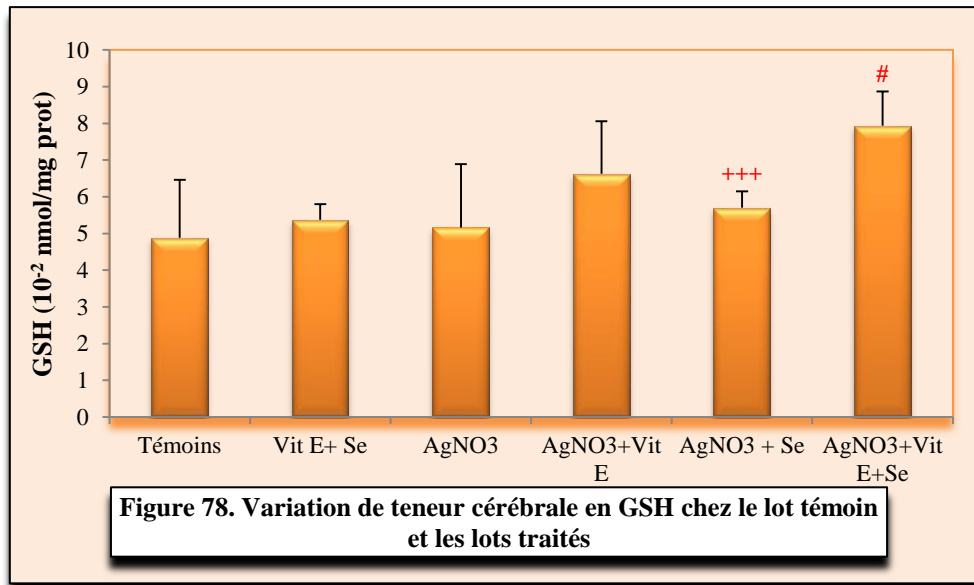


Figure 78. Variation de teneur cérébrale en GSH chez le lot témoin et les lots traités

# (p ≤ 0.05): différence significative entre AgNO<sub>3</sub> et AgNO<sub>3</sub> + Vit E + Se;

+++ (p ≤ 0.001): différence très hautement significative entre AgNO<sub>3</sub> + Se et AgNO<sub>3</sub> + Vit E + Se

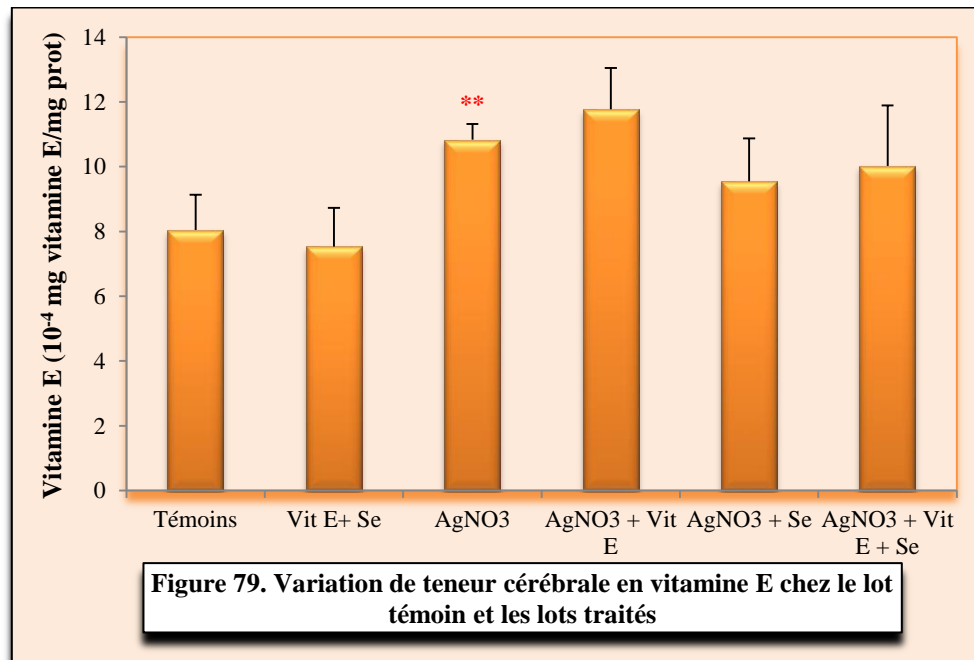


Figure 79. Variation de teneur cérébrale en vitamine E chez le lot témoin et les lots traités

\*\* (p ≤ 0.01): différence hautement significative entre AgNO<sub>3</sub> et témoins

➤ Les antioxydants enzymatiques

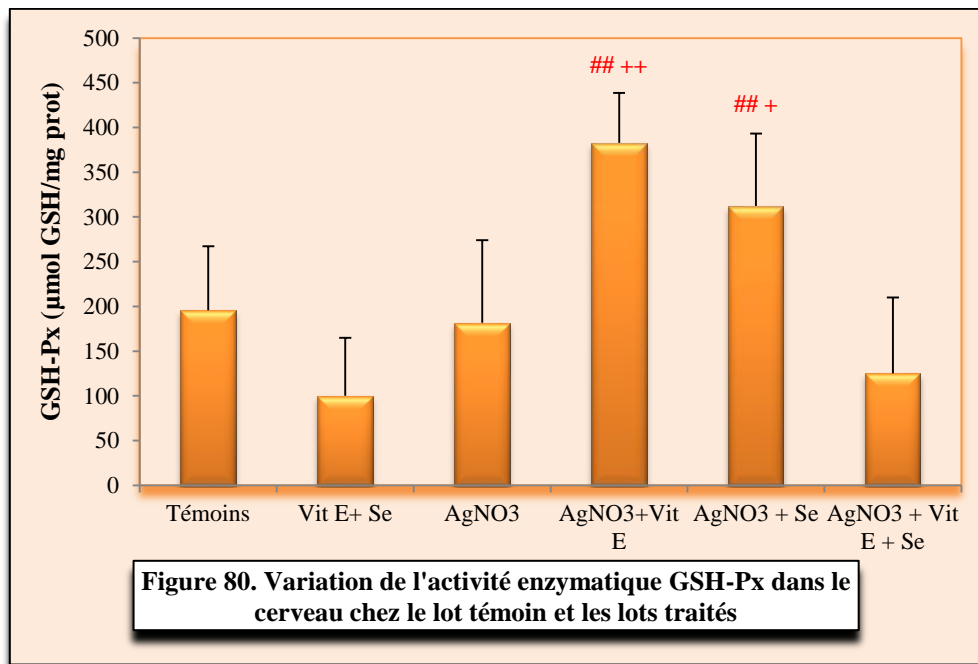
Similairement aux autres tissus, la GSH-Px du tissu cérébral chez les lots exposés à l'argent est inchangée par rapport aux témoins, mais aussi nous avons noté son augmentation chez les lots AgNO<sub>3</sub> + vit E (p ≤ 0.01: AgNO<sub>3</sub>, p ≤ 0.01: AgNO<sub>3</sub> + vit E +Se) et AgNO<sub>3</sub> + Se (p ≤ 0.01: AgNO<sub>3</sub>, p ≤ 0.05: AgNO<sub>3</sub> + vit E +Se).

A leurs tours, la GST, la CAT et la GR n'ont pas été affectées par tous les traitements utilisés pendant l'expérimentation à l'exception de la diminution significative de l'activité GR

( $p \leq 0.05$ ) chez le lot  $\text{AgNO}_3 + \text{vit E}$  par rapport au lot  $\text{AgNO}_3 + \text{vit E} + \text{Se}$  et aussi une diminution significative de l'activité CAT ( $p \leq 0.05$ ) chez le lot  $\text{AgNO}_3 + \text{Se}$  comparé au lot  $\text{AgNO}_3$ .

La SOD cérébrale est significativement réduite en présence d'argent ( $p \leq 0.05$ ), on note ainsi une augmentation remarquable chez le lot  $\text{AgNO}_3 + \text{Se}$  ( $p \leq 0.05$ :  $\text{AgNO}_3$ ,  $p \leq 0.05$ :  $\text{AgNO}_3 + \text{vit E} + \text{Se}$ ).

Les figures 80, 81, 82, 83, 84 résument les variations de l'activité enzymatique des principaux antioxydants.

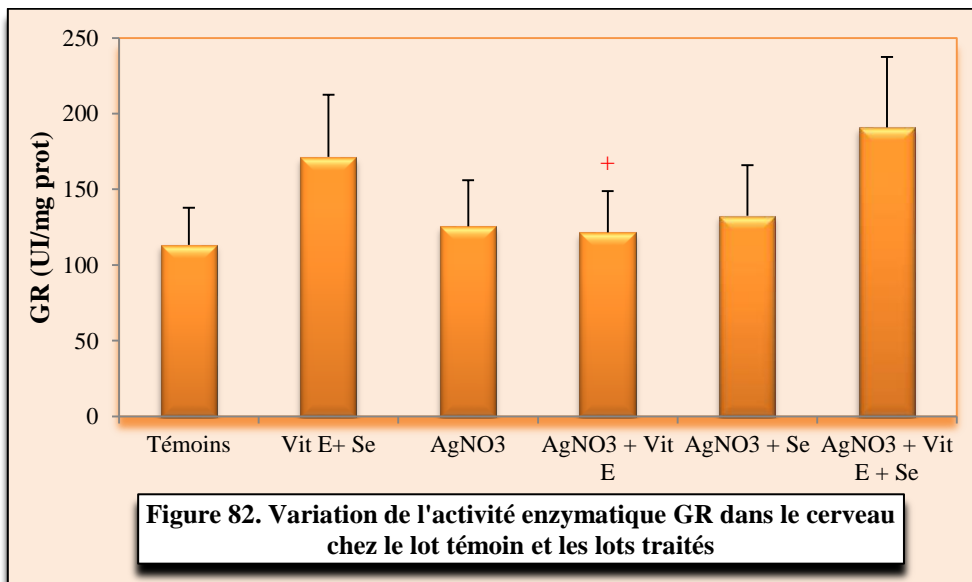
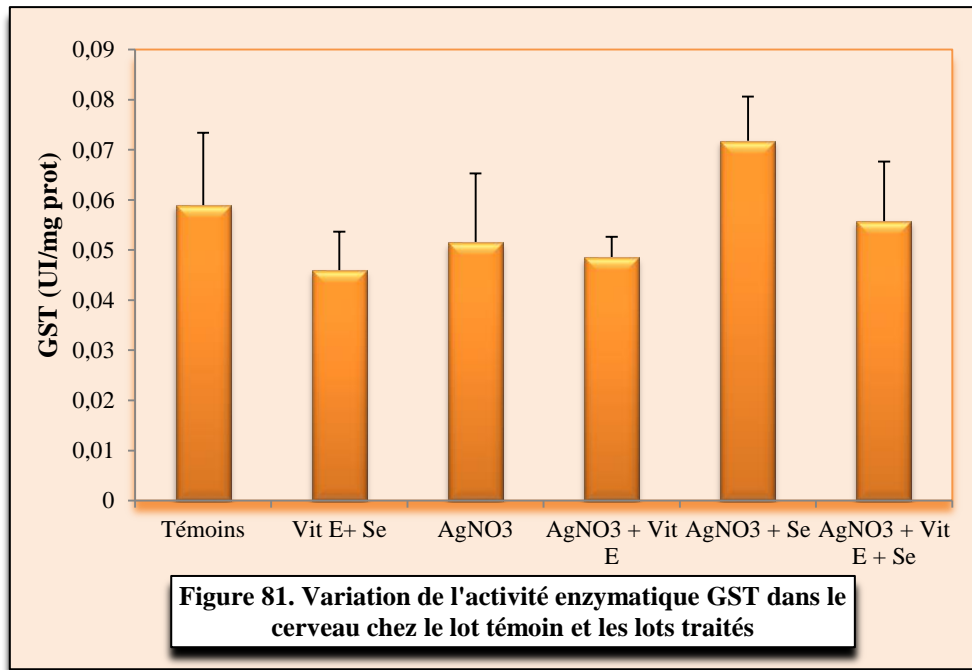


**Figure 80. Variation de l'activité enzymatique GSH-Px dans le cerveau chez le lot témoin et les lots traités**

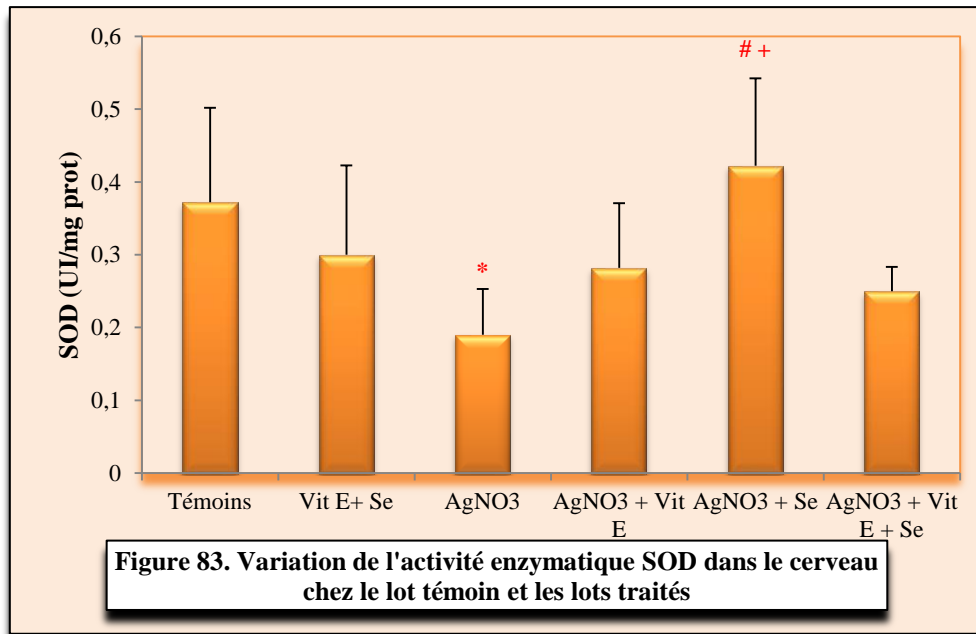
## ( $p \leq 0.01$ ): différence hautement significative entre  $\text{AgNO}_3$  et  $\text{AgNO}_3 + \text{Vit E}$  et  $\text{AgNO}_3 + \text{Se}$ ;

+ ( $p \leq 0.05$ ): différence significative entre  $\text{AgNO}_3 + \text{Se}$  et  $\text{AgNO}_3 + \text{Vit E} + \text{Se}$ ;

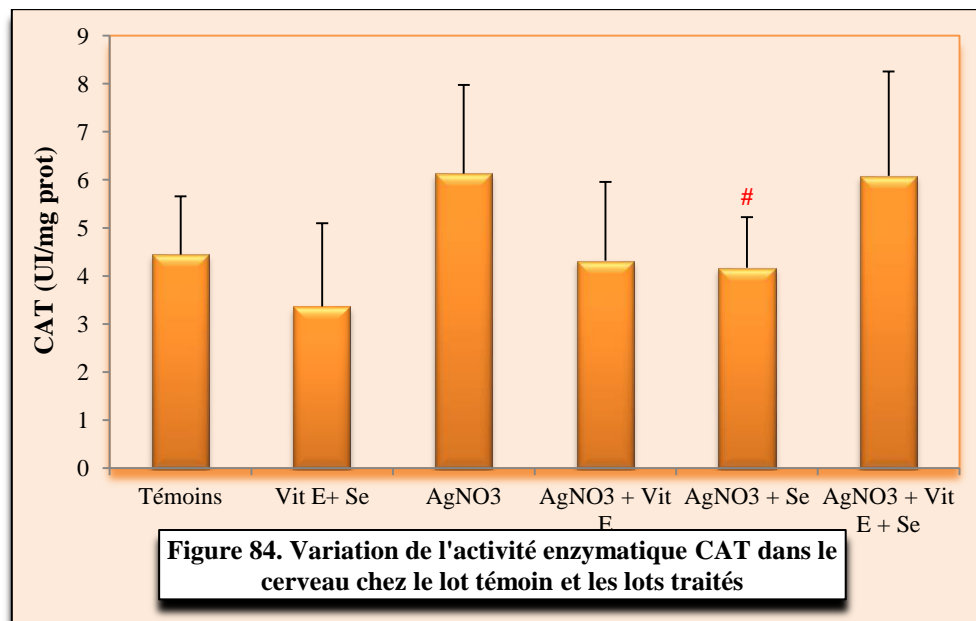
++ ( $p \leq 0.01$ ): différence significative entre  $\text{AgNO}_3 + \text{Vit E}$  et  $\text{AgNO}_3 + \text{Vit E} + \text{Se}$



<sup>+</sup>( $p \leq 0.05$ ): différence significative entre AgNO<sub>3</sub> + Vit E et AgNO<sub>3</sub> + Vit E + Se



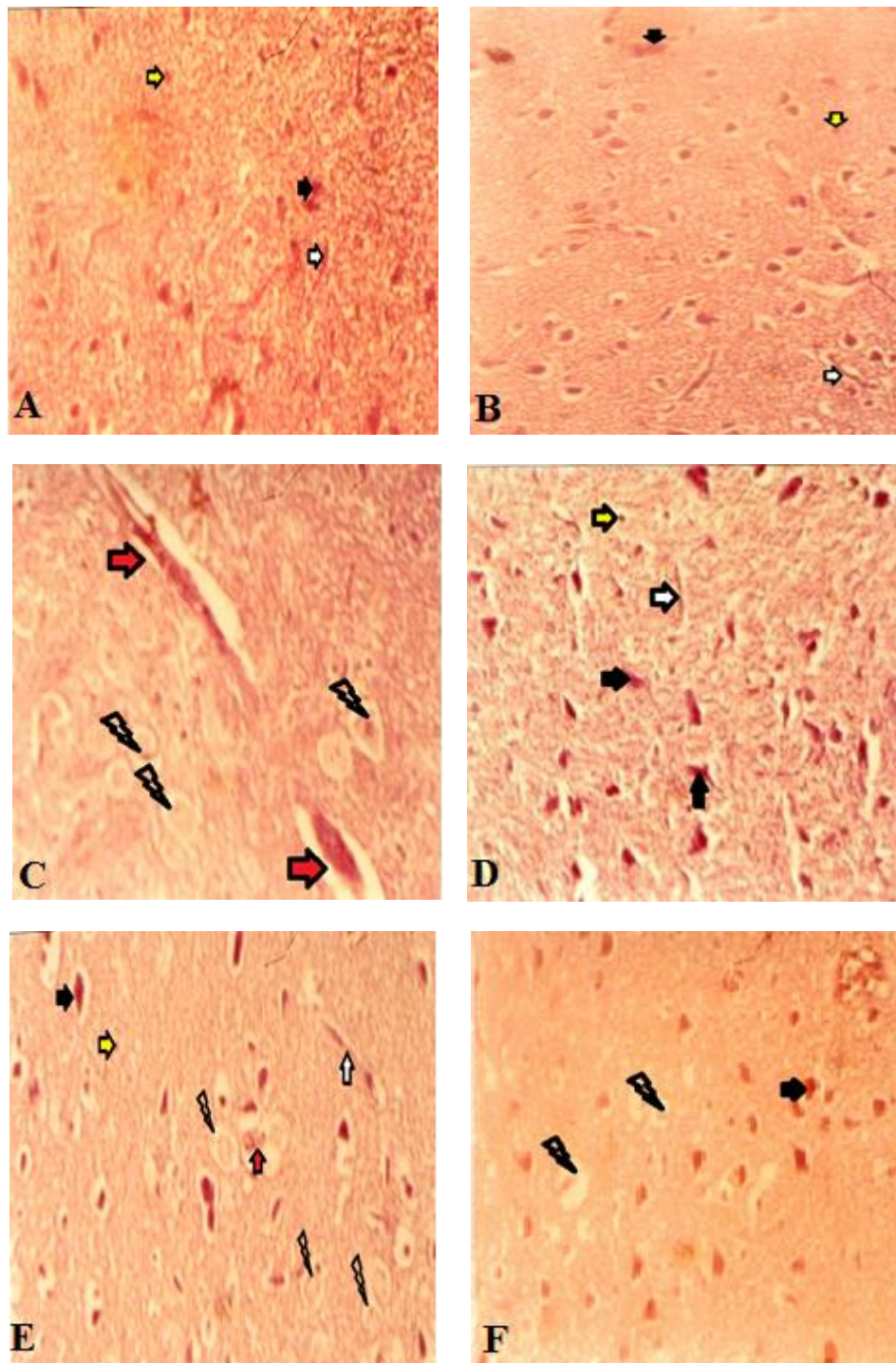
\* ( $p \leq 0.05$ ): différence significative entre AgNO<sub>3</sub> et témoins;  
 # ( $p \leq 0.05$ ): différence significative entre AgNO<sub>3</sub> et AgNO<sub>3</sub> + Vit E + Se;  
 + ( $p \leq 0.05$ ): différence significative entre AgNO<sub>3</sub> + Se et AgNO<sub>3</sub> + Vit E + Se



# ( $p \leq 0.05$ ): différence significative entre AgNO<sub>3</sub> et AgNO<sub>3</sub> + Se

### 7.1.2. Histopathologie du cerveau

L'examen histologique du tissu nerveux des rats témoins et traités par Vit E + Se a présenté une histoarchitecture normale (figure 85.A.B). Chez les rats traités par Ag, les coupes histologiques ont donné quelques désordres tels qu'une hémorragie et des vacuolisations dans la zone affectée (figure 85.C) comparé aux témoins. Les changements histopathologiques sont moins importants après administration de la vitamine E (figure 85.D) ou le sélénium (figure 85.E), ou l'association des deux (figure 85.F).



**Figure 85.** Effet d'argent et de supplémentation du vitamine E et/ou sélénium sur l'histologie de cerveau sous microscope optique. Témoins (A), Vit + Se (B), Ag (C), Ag + vit E (D), Ag + Se (E) et Ag + vit E + Se (F). Coloration éosine hématoxyline ( $\times 40$ ).  $\blacktriangleright$  neurones;  $\blacktriangleright$  neuroglia;  $\Rightarrow$  petits vaisseaux sanguins;  $\Rightarrow$  hémorragie;  $\blacktriangleright$  vacuolisations

## 7.2. Discussion

Quelques études expérimentales ainsi que des cas cliniques ont intéressé aux effets neurotoxiques d'argent. Ohbo *et al.* (1996) ont suggéré que les crises convulsives chez un patient souffrant de l'argyrie sont par conséquent dues à la présence d'argent dans le SNC. A leurs tours, Landas *et al.* (1985) ont trouvé le dépôt d'AgNO<sub>3</sub> dans les organes circumventriculaires et le noyau supraoptique et paraventriculaire de l'hypothalamus. De plus, Rungby et Danscher (1984) ont noté une hypoactivité des souris traités par Ag concluant que ce métal a affecté le fonctionnement du SNC. Rungby *et al.* (1987) ont aussi prouvé une administration directe des sels d'argent dans des rats nouveau-nés résultant des dommages aux zones particulièrement vulnérables du cerveau comme l'hippocampe.

Uniquement dans le tissu cérébral, l'argent a influencé les phospholipides membranaires par augmentation notable de la concentration de TBARS. Outre, Powers *et al.* (2010) ont mentionné les effets suivants sur les cellules neuronotypiques PC12 après une longue durée d'exposition au nitrate d'argent: un stress oxydant, une perte de viabilité et réduction de nombre des cellules. Hadrup *et al.* (2012<sup>b</sup>) ont montré aussi que les ions Ag<sup>+</sup> ont affecté la dopamine et la noradrénaline cérébrales *in vivo* et provoqué les mécanismes d'apoptose *in vitro*. Certes, dans les conditions normales, le cerveau est sensible aux dommages oxydatifs, cela pourra être due à la forte consommation d'oxygène (chez l'homme, cet organe utilise ~ 20% du glucose sérique, 20% d'oxygène circulant et occupe 2% du poids corporel), et aussi au forte teneur en acides gras polyinsaturés et ainsi à l'accumulation progressive de fer au cours de vieillissement (Ben Amara *et al.*, 2011; Devi et Kiran, 2004; Makar *et al.*, 1994). Mais paradoxalement, sa déficience en mécanismes de défense antioxydant et sa faible renouvellement cellulaire (Ilhan *et al.*, 2004). Évidemment, les oxydants peuvent contribuer aux pertes neuronales dans l'ischémie cérébrale et l'hémorragie, ainsi que dans la dégénération des neurones dans le vieillissement et aussi dans différentes maladies neurodégénératives (Bourre *et al.*, 2000; Otitoju *et al.*, 2008). Semblablement au foie, on assiste à une réduction et une élévation remarquables de l'activité SOD et de la teneur en vitamine E respectivement.

De plus, l'examen sous microscope a révélé aussi quelques altérations dans les zones affectées, par l'apparition des vacuolisations ainsi qu'une hémorragie. Ces changements neurodégénératifs pourront être dus aux ERO.

Van Der Zande *et al.* (2012) ont indiqué que le taux d'argent dans le sang est 23 fois plus inférieur que dans le cerveau. De même que les testicules, ce groupe a noté la persistance du métal dans le cerveau après deux mois de traitement. Une étude plus ancienne de Rungby et

Danscher (1983) a montré qu'après 13 mois d'une injection intrapéritonéale, l'argent est toujours présent dans le cerveau, ils ont suggéré que son accumulation dans cet organe pourra durer une longue période. D'après les chercheurs, la capacité d'argent de franchir la barrière hématoencéphalique est inquiétante grâce aux effets neurotoxiques mentionnés précédemment, mais des études supplémentaires sont toujours nécessaires.

La vitamine E a diminué le taux des radicaux libres agissant sur les biomolécules de nature lipidique, en revanche, elle a amélioré l'activité GSH-Px, la supplémentation a fait aussi augmenter la teneur cérébrale en cette vitamine, ce qui est aussi révélé par autres investigateurs (Devi et Kiran, 2004; Hong *et al.*, 2004; Kabay *et al.*, 2009).

Sûrement, le corps animal est incapable de synthétiser la vitamine E d'où la dépendance de sa concentration tissulaire avec l'alimentation, les cellules nerveuses sont déjà trouvées avec des proportions importantes de la vitamine E après supplémentation spécialement les astrocytes, ensuite les neurones. Une carence résulte un certain nombre de symptômes neurologiques compris des troubles de l'équilibre et de la coordination, une lésion des nerfs sensoriels, une faiblesse musculaire et des dommages à la rétine de l'œil (Ben Amara *et al.*, 2011; Makar *et al.*, 1994).

De sa part, le sélénium a aussi réduit les TBARS, ainsi que l'activité CAT et augmenté l'activité GSH-Px et SOD cérébrales par rapport au lot AgNO<sub>3</sub>.

Cet élément est entré dans le SNC via les récepteurs des sélénoprotéines au niveau des capillaires cérébraux, comme il peut aussi incorporer dans les sélénoprotéines nouvellement synthétisées. La supplémentation de sélénium améliore les activités de ces protéines conduisant à la diminution des radicaux libres. Cet élément de trace apparait abaisser le stress oxydant dans les ischémies cérébraux, et aussi dans les maladies d'Alzheimer et Parkinson (Ben Amara *et al.*, 2011; Bourre *et al.*, 2000).

Ces deux antioxydants semblent restaurer la neurohistologie, mais cette restauration est plus claire chez les rats supplémentés seulement par l' $\alpha$ -tocophérol ce qui est en accord avec l'étude de Yin *et al.* (2015).

***CONCLUSION ET  
PERSPECTIVES***

### CONCLUSION

Cette étude a révélé que la contamination par l'argent est responsable de l'apparition d'un certain nombre de troubles au niveau cellulaire et par conséquent au niveau tissulaire :

- une perturbation des enzymes sériques telles qu'une augmentation des activités enzymatiques LDH et lipase ainsi qu'une réduction de l'activité enzymatique PAL;
- une dyslipidémie qui se traduit par une hypercholestérolémie;
- un abaissement des protéines totales et du calcium dans le sang;
- un surcroît de nombre des hématies;
- une élévation de la concentration de l' $\alpha$ -tocophérol dans le foie et le cerveau;
- une réduction de l'activité SOD hépatique et neurale;
- une chute de GSH dans les reins;
- une diminution de GR et élévation de GST testiculaire;
- une augmentation de teneur cérébrale en MDA;
- de désordres tissulaires mais sans nécrose et/ou apoptose ni inflammation notables dans le tissu hépatique et nerveux.

Donc, notre étude n'a pas signalé un dysfonctionnement hépatique et rénal proprement dit, les testicules aussi n'ont pas présenté des signes d'une atteinte reproductive d'après les analyses utilisées, mais le surplus de MDA, marqueur biologique de la peroxydation lipidique dans le cerveau, est inquiétant grâce à la possibilité de métal à franchir la barrière hématoencéphalique et endommager cet organe, chef d'orchestre du corps humain et animal.

En revanche, la supplémentation par la vitamine E et/ou le sélénium pourra atténuer ces effets nocifs de métal sur ces différents paramètres soit en les rendant à la norme, ou par amélioration. Mais ces bienfaits semblent varier chez les lots dont la supplémentation est seulement par l'un des antioxydants ou le lot avec les deux antioxydants en association. Ainsi le pouvoir défenseur dépend de type de dosage, et de nature d'organe, cela peut refléter les rôles biologiques de ces deux micronutriments non seulement autant que des antioxydants inhibiteurs de la génération des ERO, le sélénium apparaît réduire la toxicité du métal par augmentation de sa précipitation, cela est considéré comme une sorte de détoxification.

Finalement, comme tous les xénobiotiques, la toxicité dépend principalement à la concentration et à la période d'exposition, pour cela une alimentation équilibrée, riche en antioxydants est toujours demandée.

### **En perspectives**

Il est intéressant d'approfondir cette recherche par :

- le dosage tissulaire d'argent dans les organes mentionnés précédemment ainsi que d'autres organes;
- l'utilisation de la microscopie électronique afin de dépister l'accumulation du métal au niveau des organites et voir d'éventuels dégâts cellulaire;
- une étude immunologique, génétique et sur la fonction thyroïdienne est nécessaire;
- le dosage d'un certain neurotransmetteur ainsi que de chercher le dépôt du métal dans les différentes parties de système nerveux central;
- une étude comparative entre la toxicité des ions d'argent et les nanoparticules d'argent fréquemment utilisées à l'heure actuelle.

***RÉFÉRENCES***  
***BIBLIOGRAPHIQUES***

### A

- Abate C., Patel L., Rauscher F., Curran T. (1990). Redox regulation of Fos and Jun DNA-binding activity in vitro. *Science* 249: 1157-61.
- Adrian J., Ptus J., Fragne R. (1995). *La science alimentaire de A à Z*. 2<sup>ème</sup> édition. Paris : Éd Technique Documentation – Lavoisier. 440 p.
- Al-Attar A.M. (2004). The influence of dietary grapeseed oil on DMBA-induced liver enzymes disturbance in the frog, *Rana ridibunda*. *Pakistan Journal of Nutrition* 3 (5): 304-309.
- Almofti M.R., Ichikawa T., Yamashita K., Terada H., Shinohara Y. (2003). Silver ion induces a cyclosporine a-insensitive permeability transition in rat liver mitochondria and release of apoptogenic cytochrome C. *J. Biochem.* 134: 43-49.
- Ammendola R., Mesuraca M., Russo T., Cimino F. (1994). The DNA-binding efficiency of Sp-1 is affected by redox changes. *Eur. J. Biochem.* 225: 483-9.
- Arai Y., Miyayama T., Hirano S. (2015). Difference in the toxicity mechanism between ion and nanoparticle forms of silver in the mouse lung and in macrophages. *Toxicology* 328: 84-92.
- Arthur J.R. (2000). The glutathione peroxidases. *Cell. Mol. Life. Sci.* 57(13-14): 1825-1835.
- Atiyeh B.S., Costagliola M., Hayek S.N., Dibo S.A. (2007). Effect of silver on burn wound infection control and healing: Review of the literature. *Burns* 33:139-148.
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). (1990). *Toxicological Profile for Silver*. Atlanta : U.S. Public Health Service. 157 p. Disponible sur : [«https://www.atsdr.cdc.gov/ToxProfiles/tp146.pdf»](https://www.atsdr.cdc.gov/ToxProfiles/tp146.pdf) [consulté Janvier 2013]
- Arousseau B., Durand D., Gruffat D. (2004). Contrôle des phénomènes oxydatifs pendant la gestation chez les monogastriques et les ruminants. *INRA Prod. Anim.* 17(5): 339-354.

### B

- Baldi C., Minoia C., Nucci A.D., Capodaglio E., Manzo L. (1988). Effects of silver in isolated rat hepatocytes. *Toxicology Letters* 41: 261-268.
- Baldwin J.S., Lee I., Leung T.K., Muruganandam A., Mutus B. (1995). Identification of the site of nonenzymatic glycation of glutathione peroxidase: rationalization of the

glycation-related catalytic alterations on the basis of three-dimensional protein structure. *Biochim. Biophys. Acta.* 1247(1): 60–64.

- Barouki R. (2006). Stress oxydant et vieillissement. *Médecine/Sciences* 22: 266-72.
- Beck M.A. (2007). Micronutrient regulation of host-pathogen interactions selenium and vitamin E status: impact on viral pathogenicity<sup>1–3</sup>. *The Journal of Nutrition Symposium* 137(5): 1338-1340.
- Beckett C.J., Beddows S.E., Morrice P.C., Nicol F., Arthur T.R. (1987). Inhibition of hepatic deiodination of thyroxine is caused by selenium deficiency in rats. *Biochem.* 248: 443-7.
- Ben Amara I., Soudani N., Hakim A., Troudi A., Zeghal K.M., Boudawara T., Zeghal N. (2011). Selenium and vitamin E, natural antioxidants, protect rat cerebral cortex against dimethoate-induced neurotoxicity. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 101: 165-174.
- Berzelius J.J. (1818). Additional observations on lithion and selenium. *Ann Philos.* 11: 373-5.
- Bilberg K., Malte H., Wang T., Baatrup E. (2010). Silver nanoparticles and silver nitrate cause respiratory stress in Eurasian perch (*Perca fluviatilis*). *Aquatic Toxicology* 96: 159-165.
- Black R.S., Whanger P.D., Tripp M.J. (1980). Influence of silver, mercury, lead, cadmium, and selenium on glutathione peroxidase and transferase activities in rats. *Biol. Trace Elem Res.* 1: 313-324.
- Bonnefont-Rousselot D., Théron P., Delattre J. (2003). Radicaux libres et anti-oxydants. *In: Delattre J., Durand G., Jardillier J-C. Biochimie pathologique. Aspects moléculaires et cellulaires.* Paris : Éd Médecine-Sciences Flammarion. pp 59-80.
- Borek C., Ong A., Mason H., Donahue L., Biaglow J.E. (1986). Selenium and vitamin E inhibit radiogenic and chemically induced transformation in vitro via different mechanisms. *Proc Natl Acad Sci.* 83:1490-4.
- Borg J., Reeber A., Andres C. (2008). *Biochimie métabolique.* 2<sup>ème</sup> édition. Paris : Ellipses Edition Marketing S.A. PCEM. 285 p. Cours et Qcm.
- Bourre J.M., Dumonta O., Cleament M., Dinha L., Droy-Lefaix M.T., Christen Y. (2000). Vitamin E deficiency has different effects on brain and liver phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase activities in the rat. *Neuroscience Letters* 286: 87-90.

- Bours V., Dejardin E., Bonizzi G., Merville M-P., Piette J. (1998). Le facteur transcriptionnel NFkB: rôle au cours de l'oncogenèse et de la réponse au traitement anticancéreux. *Médecine/Sciences. Synthèse* 14: 566-71.
- Bradford M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantities of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein binding. *Anal Biochem.* 72: 248-54.
- Brandt D., Park BS B., Hoang M., Jacobe H.T. (2005). Argyria secondary to ingestion of homemade silver solution. *JAm Acad Dermatol.* 53(2): S105-7.
- Brauner C.J., Wood C.M. (2002). Iono-regulatory development and the effect of chronic silver exposure on growth, survival and, sublethal indicators of toxicity in early life stages of rain bowtrout. *J Comp Physiol B.* 172: 153-162.
- Buccolo G., David H. (1973). Quantitative determination of serum triglycerides by use of enzymes. *Clin Chem.* 19(5): 476-82.
- Buonocore G., Perrone S., Tataranno M.L. (2010). Oxygen toxicity: chemistry and biology of reactive oxygen species. *Semin ars in fetal α Neonatal Medicine* 15: 186-190.
- Burtis C.A., Ashwood E.R. (1999). *Tietz Textbook of clinical chemistry.* 3<sup>rd</sup> edition. Philadelphia : W.B. Saunders Co. pp 750-785.

### C

- Cash T.P., Pan Y., Simon M.C. (2007). Reactive oxygen species and cellular oxygen sensing. *Free Radic. Biol. Med.* 43(9): 1219-1225.
- Catignani G.L., Chytil F., Darby W.J. (1974). Vitamin E deficiency: immunochemical evidence for increased accumulation of liver xanthione oxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 71: 1966-1968.
- Cha K., Hong H.W., Cho Y.G., Lee M.J., Park J.H., Chae H.K., Ryu G., Myung H. (2008). Comparison of acute responses of mice livers to short-term exposure to nano-sized or micro-sized silver particles. *Biotechnol. Lett.* 30(11):1893-1899.
- Chavance M., Herbert B., Fournier C., Janot C., Vernhes G. (1989). Vitamin status, immunity, and infections in an elderly population. *Eur. J. Clin. Nutr.* 43: 825-37.
- Cheraghi J., Hosseini E., Hoshmandfar R., Sahraei R. (2013). Hematologic parameters study of male and female rats administrated with different concentrations of silver nanoparticles. *Int. J. Agri. Crop Sci.* 5(7): 789-796.

- Choi O., Deng K.K., Kim N-J., Ross L., Surampalli R.Y., Hu Z. (2008). The inhibitory effects of silver nanoparticles, silver ions, and silver chloride colloids on microbial growth. *Water Research* 42(12): 3066-3074.
- Chou T.D., Gibran N.S., Urdahl K., Lin E.Y., Heimbach D.M., Engrav L.H. (1999). Methemoglobinemia secondary to topical silver nitrate therapy-a case report. *Burns* 25(6): 549-52.
- Chow C.K. (1985). Vitamin E and blood. *World Rev. Nutr. Diet.* 45: 133-166.
- Chow C.K. (1990). Effects of dietary vitamin E and selenium on rats: pyruvate kinase, glutathione peroxidase and oxidative damage. *Nutrition research* 10: 183-194.
- Ciji A., Saha N.P., Pala A.K., Akhtara M.S. (2013). Physiological changes in *Labeo rohita* during nitrite exposure: Detoxification through dietary vitamin E. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 158(2): 122–129.
- Clark W.L., Balinski E.L., Maie S.S., Zak B. (1975). Spectrometric Study of a direct determination of Serum Calcium. *Microchem. J.* 20: 22-3.
- Clark L.C., Combs G.F., Turnbull B.W., Slate E.H., Chalker D.K., Chow J., Davis L.S., Glover R.A., Graham G.F., Gross E.G. *et al.* (1996). Effects of selenium supplementation for cancer prevention in patients with carcinoma of the skin. A randomized controlled trial. Nutritional Prevention of Cancer Study Group. *JAMA.* 276(24): 1957–63.
- Collongues R. (1996). Argent. *In: Encyclopaedia Universalis.* 2<sup>ème</sup> édition. Paris. pp 903-906.
- Connerty H.V. *et al.* (1996). *Ann J Clin Path.* 45(3): 200-296.
- Coombs C.J., Wan A.T., Masterton J.P., Conyers R.A.J., Pedersen J., Chia Y.T. (1992). Do burn patients have a silver lining ?. *Burns* 18(3): 179-184.
- Cortese-Krott M.M., Münchow M., Pirev E., Hebner F., Bozkurt A., Uciechowski P., Pallua N., Kröncke K.D., Suschek C.V. (2009). Silver ions induce oxidative stress and intracellular zinc release in human skin fibroblasts. *Free Radical Biology & Medicine* 47(11): 1570-1577.
- Cottet M.J. *et al.* (1965). Dosage des lipids sériques par la méthode sulfo-phospho-vanillique (1) de E Chabrol et R Charonnat. *Académie National de Médecine* 149: 331-338.
- Curtin J.F., Donovan M., Gotter T.G. (2002). Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis. *Journal of Immunological Methods* 265: 49-72.

- Cuvelier C., Dotreppe O., Istasse L. (2003). Chimie, sources alimentaires et dosage de la vitamin E. *Ann. Méd. Vét.* 147: 315-324.

### D

- Dalton T., Li Q., Bittel D., Liang L.G.K.A. (1996). Oxidative stress activates metal-responsive transcription factor I activity. *J. Biol. Chem.* 271: 26233-41.
- Daly J.A., Ertingshausen G. (1972). Direct method for determining inorganic phosphate in serum with the 'centrifichem'. *Clin. Chem.* 18(3): 263-265.
- Das K.K., Dasgupta S. (2000). Effect of nickel on testicular nucleic acid concentrations of rats on protein restriction. *Biol. Trace. Elem. Res.* 73(2): 175-180.
- Desai I.D. (1984). Vitamin E analysis method for animal tissue. *Methods Enzymol.* 105: 138-143.
- Devi S.A., Kiran T.R. (2004). Regional responses in antioxidant system to exercise training and dietary Vitamin E in aging rat brain. *Neurobiology of Aging* 25: 501-508.
- Djurasevic S.F., Djordjevic J., Jasnica N., Lakic I., Vujovic P., Cvijic G. (2010). The influence of vitamin E supplementation on the oxidative status of rat interscapular brown adipose tissue. *Arch. Biol. Sci.* 62(4): 993-1003.
- Di Vincenzo G.D., Giordano C.J., Schriever I.S. (1985). Biological monitoring of workers exposed to silver. *International Archives of Occupational and Environmental Health* 56(3): 207-215.
- Doumas B.T., Watson W.A., Biggs H.G. (1971). Albumin standards and the measurement of serum albumin with bromocresol green. *Clin. Chim. Acta.* 31(1): 87-96.
- Drake P.L., Hazelwood K.J. (2005). Exposure related health effects of silver and silver compounds: a review. *Ann. Occup. Hyg.* 49(7): 575-585.
- Draper H.H. (1985). *Advances in Nutritional Research*. Vol 7. New York : Plenum. 290p. Disponible sur : [«http://books.google.dz/books?id=f1KpAAAAIAAJ&dq=Draper+Advances+in+Nutritional+Research+1985»](http://books.google.dz/books?id=f1KpAAAAIAAJ&dq=Draper+Advances+in+Nutritional+Research+1985) [consulté Avril 2016]
- Droge W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* 82(1): 47-95.
- Duvoid I. (1999). Le sélénium, un élément essentiel parfois redoutable où le rapport bénéfice/risque du sélénium. DESS en informatique Documentaire. Lyon : Université Claude Bernard. 99 p. Disponible sur :

«<http://enssibal.enssib.fr/bibliotheque/documents/dessid/rbduvoid.pdf> » [consulté Mars 2016]

### E

- East B.W., Boddy K., Williams E.D., Macintyre D., Mclay A.L. (1980). Silver retention, total body silver and tissue silver concentrations in argyria associated with exposure to an anti-smoking remedy containing silver acetate. *Clinical and Experimental Dermatology* 5(3): 305-311.
- Ebabe Elle R., Gaillet S., Vidé J., Romain C., Lauret C., Rugani N., Cristol J.P., Rouanet J.M. (2013). Dietary exposure to silver nanoparticles in Sprague–Dawley rats: Effects on oxidative stress and inflammation. *Food and Chemical Toxicology* 60: 297-301.
- European Commission (EC). (2000). Toxicological data on colouring agents for medicinal products: E174 Silver. The scientific committee on medicinal products and medical devices. Health & consumer protection directorate general. 13 p.  
Disponible sur :  
«[http://ec.europa.eu/health/ph\\_risk/committees/scmp/documents/out30\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/scmp/documents/out30_en.pdf)»  
[consulté Janvier 2016]
- Eisler R. (1996). Silver hazards to fish, wildlife, and invertebrate: a synoptic review. *Biological Review*. No. 32. U.S. Department of the interior Washington, DC. 63 p.  
Disponible sur :  
«[https://www.pwrc.usgs.gov/eisler/CHR\\_32\\_Silver.pdf](https://www.pwrc.usgs.gov/eisler/CHR_32_Silver.pdf)» [consulté Février 2012]
- Ellman G.L. (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* 82: 70-7.
- Erdogan Z., Erdogan S., Celik S., Unlu V. (2005). Effects of ascorbic acid on cadmium-induced oxidative stress and performance of broilers. *Biol. Trace. Elem. Res.* 104: 19-31.
- Environmental Protection Agency (EPA). (1980). Ambient water quality criteria for silver. Washington (DC). EPA 440(5): 80-071.
- Esterbauer H., Cheeseman K. (1990). Determination of aldehydic lipid peroxidation Products: Malonaldehyde and 4-hydroxynenal. *Enzymology* 186: 407-421.
- Evans G.O., O'Brien P.J., Watterson C.L. (2009). Assessment of Hepatotoxicity. *In* : Evans G.O. *Animal clinical chemistry*. Boca Raton : Taylor & Francis Group. pp 37-66.

- Evans H.M., Bishop K.S. (1922). On the existence of a hitherto unrecognized dietary factor essential for reproduction. *Science* 56: 650-1.

### F

- Favier A. (2003). Le stress oxydant: Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *Mécanismes biochimiques* 108-115.
- Fausto N., Campbell J.S. (2003). The role of hepatocytes and oval cells in liver regeneration and repopulation. *Mechanisms of Development* 120(1): 117–130.
- Feki M., Souissi M., Mebazza A. (2001). La vitamine E: structure, métabolisme et fonctions. *Ann. Med. Interne* 152(6): 384-391.
- Fewtrell L. (2014). Silver: Water disinfection and toxicity. Centre for Research into Environment and Health. Spring. 53 p.  
Disponible sur :  
«[http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/dwq/chemicals/Silver\\_water\\_disinfection\\_toxicity\\_2014V2.pdf](http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/chemicals/Silver_water_disinfection_toxicity_2014V2.pdf)» [consulté Juillet 2015]
- Flohe L., Gunzler W. A. (1984). Analysis of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.* 105: 114-21.
- Fontaine M., Valli V.E.O., Young G. (1977). Studies on Vitamin E and selenium deficiency in young pigs. III. Effect on kinetics of erythrocyte production and destruction. *Canadian journal of comparative medicine* 41(1): 57-63.
- Fontenoy C., Sellal K-O. (2010). L'argent dans les dispositifs médicaux: marketing ou réel intérêt clinique?. *Le pharmacien hospitalier* 45: 131-141.
- Fowler B.A., Nordberg G.F. (1986). Silver. *In*: Friberg L., Nordberg G.F., Vouk V.B. *Handbook On The Toxicology Of Metals*. 2<sup>nd</sup> edition. Vol 2. Amsterdam : Elsevier. pp 521-531.
- Funck J.A., Danger M., Gismondi E., Cossu-Leguille C., Guérolde F., Felten V. (2013). Behavioural and physiological responses of *Gammarus fossarum* (Crustacea Amphipoda) exposed to silver. *Aquatic Toxicology* 142-143: 73-84.
- Fung M.C., Bowen D.L. (1996). Silver products for medical indications: risk-benefit assessment. *Clinical Toxicology* 34(1): 119-126.

- Furchner J.E., Richmond C.R., Drake G.A. (1968). Comparative metabolism of radionuclides in mammals- IV. Retention of silver -110m in the mouse, rat, monkey and dog. *Health Physics* 15(6): 505-514.

### G

- Galvez F., Hogstrand C., McGeer J.C., Wood C.M. (2001). The physiological effects of a biologically incorporated silver diet on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology* 55: 95-112.
- Garnier R. (2000). Argent. *In*: Bismuth C., Baud F., Conso F., Dally S., Frejaville J-P., Garnier R., Jaeger A. *Toxicologie clinique*. 5<sup>ème</sup> édition. Paris : Éd Médecine-Sciences Flammarion. pp 562-564.
- Goldberg D.M., Spooner R.J. (1983). *In*: *Methods of enzymatic analysis*. 3<sup>rd</sup> edition. Vol 3. Deerfield Beach. Fl : Éd. Bergmeyer H.V. pp 258-265. Verlag Chemie.
- Gordon N. (2001). Hereditary vitamin E deficiency. *Dev Med Child Neurol*.43: 133-5.
- Gouttebel M.C., Zhang G.H., Saingre B., Joyeux H. (1996). Rôle protecteur d'un apport oral de selenium et de vitamin E vis-à-vis de la cardiotoxicité induite par les anthracyclines chez le rat. *Nutr. Clin. Métabol.* 10: 69-76.
- Grether-Beck S., Olaizola-Horn S., Schmitt H., Grewe M., Jahnke A., Johnson J.P., Briviba K., Sies H., Krutmann J. (1996). Activation of transcription factor AP-2 mediates UVA radiation- and singulet oxygen-induced expression of the human intercellular adhesion molecule 1 gene. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 93: 14586-91.
- Greulich C., Braun D., Peetsch A., Diendorf J., Siebers B., Epple M., Koller M. (2012). The toxic effect of silver ions and silver nanoparticles towards bacteria and human cells occurs in the same concentration range. *The Royal Society of Chemistry Advances* 2: 6981-6987.
- Guillard J-C., Lequeu B. (2009). *Encyclopédie des vitamines. Du nutriment au médicament: Données fondamentales; métabolisme et fonction*. Vol 1. Paris : Éd Médicales internationales, édition Tec et Doc. 1120 p.
- Guillard D. (2011). Sélénium et ses composés. INERIS-Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques. Version N°2. Paris. DR C-08-83451-012698. p 133. Disponible sur : [www.ineris.fr/substances/fr/substance/getDocument/3012](http://www.ineris.fr/substances/fr/substance/getDocument/3012) [consulté Mars 2016]

- Gutteridge J.M.C. (1993). Free radicals in diseases processes: a complication of cause and consequence. *Free Radic Res Commun.* 19: 141-58.
- Guyton K., Xu Q., Holbrook N. (1996). Induction of the mammalian stress response gene GADD153 by oxidative stress. Rôle of AP-1 element. *Biochem.* 314: 547-54.

### H

- Habig W.H., Pabst M.J., Jakoby W.B. (1974). Glutathione S-transferase. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chm.* 249: 7130-7139.
- Hadek R. (1966). Preliminary report on the cellular effect of intravital silver in the mouse ovary. *J. Ultra Struct. Re.* 15(1): 66-73.
- Hadrup N., Loschner K., Bergström A., Wilcks A., Gao X., Yogel U., Frandsen H.L., Larsen E.H., Lam H.R., Mortensen A. (2012<sup>a</sup>). Subacute oral toxicity investigation of nanoparticulate and ionic silver in rats. *Arch Toxicol.* 86:543-551.
- Hadrup N., Loschner K., Mortensen A., Sharma A., Qvortrup K., Larsen E.H., Lam H.R. (2012<sup>b</sup>). The similar neurotoxic effects of nanoparticulate and ionic silver in vivo and in vitro. *Neuro Toxicology* 33: 416-423.
- Hadrup N., Lam H.R. (2014). Oral toxicity of silver ions, silver nanoparticles and colloidal silver-a review. *Regulatory toxicology and Pharmacology* 68: 1-7.
- Haleng J., Pincemail J., Defrange J.O., Charlier C., Chapelle J.P. (2007). Oxidative stress. *Rev Med Liege* 62(10): 628-638.
- Ham A.J., Liebler D.C. (1995). Vitamin E oxidation in rat liver mitochondria. *Biochemistry* 34: 5754-5761.
- Ham K.N., Tange J.D. (1972). Silver deposition in rat glomerular basement membrane. *Aust. J. Biol. Med. Sci.* 50: 423-434.
- Harman D. (1956). Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol.* 11(3): 298-300.
- Harris J.C., Rumack B.H., Peterson R.G., McGuire B.M. (1979). Methaemoglobinemia resulting from absorption of nitrates. *JAMA.* 242: 2869-2871.
- Havarinasab S., Pollard K.M., Hultman P. (2009). Gold and silver induced murine autoimmunity – requirement for cytokines and CD 28 in murine heavy metal-induced autoimmunity. *Clin. Exp. Immunol.* 155: 567-576.
- Henny J., Schiele F. (1981). Phosphatases alcalines totales. Variations biologiques et

valeurs de référence. *In*: Siest G., Henny J., Schiele F. Interprétation des examens de laboratoire. pp 284-298. Karger Bâle.

- Hiriart-Baer V.P., Fortin S., Lee D.Y., Campbell P.G.C. (2006). Toxicity of silver to two freshwater algae, *Chlamydomonas reinhardtii* and *Pseudokirchneriella subcapitata*, grown under continuous culture conditions: Influence of thiosulphate. *Aquat Toxicol.* 78(2):136–148.
- Hmidi N., Kessabi M., Bénard P., Lachkar H., Hamliri A., Benjelloun W. (1996). Sélénium et fonction thyroïdienne. *MINI-SYNTÈSE médecine/sciences* 12: 1142-4.
- Holler J.S., Fowler B.A., Nordberg G.R. (2015). Silver. *In*: Nordberg G.F., Fowler B.A., Nordberg M., Friberg L. Handbook on the toxicology of metals. 4<sup>th</sup> edition. Academic Press/Elsevier. pp 1209-1216.
- Hollinger M.A. (1996). Toxicological aspects of topical silver pharmaceuticals. *Git. Rev. Toxicol.* 26: 255-260.
- Hong C.B., Chow C.K. (1988). Induction of eosinophilic enteritis and eosinophils in rats by vitamin E and selenium deficiency. *Exp Mol Pathol.* 48: 182-192.
- Honga J.H., Kima M-J., Parkb M-R., Kwagc O-G., Leed I-S., Byune B.H., Leef S-C., Leeg K-B., Rhee S-J. (2004). Effects of vitamin E on oxidative stress and membrane fluidity in brain of streptozotocin-induced diabetic rats. *Clinica Chimica Acta.* 340: (1-2) 107-115.
- Hopps E., Noto D., Caimi G., Averna M.R. (2010). A novel component of the metabolic syndrome: the oxidative Stress. *Nutrition, Metabolism et cardiovascular Diseases* 20: 72-77.
- Hornig B., Arakawa N., Kohler C., Dresler H. (1998). Vitamin C improves endothelial function of conduit arteries in patients with chronic heart failure. *Circulation* 97: 363-8.
- Houlot R. (1984). Techniques d'histopathologie et de cytopathologie. Éd Maloine. 19-21, 225–227.
- Humphreys S.D., Routledge P.A. (1998). The toxicology of silver nitrate. *Adverse Drug React Toxicol Rev.* 17(2-3): 115-43.

### I

- Ibrahim W., Bhagavan N., Chopra R.K., Chow C.K. (2000). Dietary coenzyme Q 10 and vitamin E alter the status of these compounds in rat tissues and mitochondria. *Nutr J.* 130: 2343-2348.

- Iglesias P., Selgas R., Romero S., Díez J.J. (2013). Selenium and kidney disease. *J Nephrol.* 26(2): 266-272.
- Ilhan A., Gurel A., Armutcu F., Kamisli S., Iraz M., Akyol O., Ozen S. (2004). Ginkgo biloba prevents mobile phone-induced oxidative stress in rat brain. *Clinica Chimica Acta.* 340: 153-162.
- Imai H., Nakagawa Y. (2003). Biological significance of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx, GPx4) in mammalian cells. *Free Radic Biol Med.* 15(342): 145-69.

### J

- Jacobs R. (2006). Argyria: my life story. Dermatologic disquisitions and other essays. *Clinics in Dermatology* 24(1): 66-69.
- Jelkmann W. (2011). Regulation of erythropoietin production. *J Physiol.* 589(6): 1251-8.
- Jeong G.N., Jo U.B., Ryu H.Y., Kim Y.S., Song K.S., Yu I.J. (2010). Histochemical study of intestine mucins after administration of silver nanoparticles in Sprague Dawley rats. *Arch.Toxicol.* 84: 63-69.
- Jurczuk M., Moniuszko-Jakoniuk J., Rogalska J. (2006). Glutathione-Related enzyme activity in liver and kidney of rats exposed to cadmium and ethanol. *Polish J. of Environ. Stud.* 15(6): 861-868.

### K

- Kabay S.C., Ozden H., Guven G., Ustuner M.C., Degirmenci I., Olgun E.G., Unal N. (2009). Protective effects of vitamin E on central nervous system in streptozotocin-induced diabetic rats. *Clin Invest Med.* 32: E314-E321.
- Kath M.A., Shupp J.W., Matt S.E., Shaw J.D., Johnson L.S., Pavlovich A.R., Brant J.D., Mete M., Jeng J.C., Jordan M.H. (2011). Incidence of methemoglobinemia in patients receiving cerium nitrate and silver sulfadiazine for the treatment of burn wounds: a burn center's experience. *Wound Repair Regen.* 19: 201-4.
- Kim E., Maeng J.H., Lee D.H., Kim J.M. (2009). Correlation of biomarkers and histological responses in manufactured silver nanoparticle toxicity. *Toxicol. Environ. Health. Sci.* 1(1): 8-16.

- Kim K.R., Kim J.K., Rhee S.J. (2001). Effects of vitamin E on arachidonic acid cascade in platelets and aorta of acute cadmium poisoned rats. *Nutrition* 21: 657-665.
- Kim Y.S., Kim J.S., Cho H.S., Rha D.S., Kim J.M., Park J.D., Choi B.S., Lim R., Chang H.K., Chung YH. *et al.* (2008). Twenty-eight-day oral toxicity, genotoxicity, and gender related tissue distribution of silver nanoparticles in Sprague Dawley rats. *Inhal Toxicol.* 20(6): 575-583.
- Kim Y.S., Song M.Y., Park J.D., Song K.S., Ryu H.R., Chung Y.H., Chang H.K., Lee J.H., Oh K.H., Kelman B.J. *et al.* (2010). Subchronic oral toxicity of silver nanoparticles. *Part Fibre Toxicol.* 7: 20.
- Kourinou K.M., Mazonakis M., Lyraraki E., Stratakis J., Damilakis J. (2013). Scattered dose to radiosensitive organs and associated risk for cancer development from head and neck radiotherapy in pediatric patients. *Phys Med.* 29(6): 650–5.
- Kulthong K., Maniratanachote R., Kobayashi Y., Fukami T., Yokoi T. (2012). Effects of silver nanoparticles on rat hepatic cytochrome P450 enzyme activity. *Xenobiotica* 42(9): 854-862.
- Kumar B.S., Tiwari S.K., Manoj G., Kunwar A., Amrita N., Sivaram G. *et al.* (2010). Anti-ulcer and antimicrobial activities of sodium selenite against *Helicobacter pylori*: In vitro and in vivo evaluation. *Scand J Infect Dis.* 42(4): 266–74.
- Kumar R., Münstedt H. (2005). Silver ion release from antimicrobial polyamide/Silver composites. *Biomaterials* 26: 2081-2088.

### L

- Lacour S. (2010). La régulation des nanotechnologies: Clair-obscur normatif. « Droit des technologies ». Bruxelles: Éd Larcier Groupe De Boeck. 286 p. Disponible sur : «[https://books.google.dz/books?id=sfEpAAQBAJ&pg=PA13&hl=fr&source=gbs\\_toc\\_r&cad=3#v=onepage&q&f=false](https://books.google.dz/books?id=sfEpAAQBAJ&pg=PA13&hl=fr&source=gbs_toc_r&cad=3#v=onepage&q&f=false)» [consulté Aout 2016]
- Landas S., Fischer J., Wilkin L.D., Mitchell L.D., Johnson A.K., Turner J.W., Theriac M., Moore K.C. (1985). Demonstration of regional blood-brain barrier permeability in human brain. *Neuroscience letters* 57: 251-256.
- Landrieu P. (1987). Tocopherol: vitamine E. *In*: Munnich A, Ogier H., Saudubray J.M. Les vitamines: aspects métaboliques, génétiques, nutritionnels et thérapeutiques. Paris : Masson. pp 57-79.

- Lansdown A.B.G. (2002). Silver 2: toxicity in mammals and how its products aid wound repair. *Journal of wound care*. 11(5): 173-177.
- Lansdown A.B.G. (2006). Silver in health care: Antimicrobial effects and safety in use. *Curr Probl Dermatol*. Basel, Karger. 33: 17-34.
- Lansdown A.B.G. (2007). Critical observations on the neurotoxicity of silver. *Critical Reviews in Toxicology* 37: 237-250.
- Lansdown A.B.G. (2010<sup>a</sup>). Silver in healthcare: its antimicrobial efficacy and safety in use (Issue in toxicology). 1<sup>st</sup> edition. Cambridge : Royal Society of chemistry. 256 p.
- Lansdown A.B.G. (2010<sup>b</sup>). A pharmacological and toxicological profile of silver as an antimicrobial agent in medical devices: A review. *Advances in pharmacological sciences* 16 p.
- Le Grusse J., Watier B. (1993). Les Vitamines, données biochimiques nutritionnelles et cliniques. Centre d'Études et d'Information sur les Vitamines. Neuilly-Sur-Seine. 303 p.
- Lin L., Gong W., Wang X., Li X., Wang S. (2011). Preparation and characterizations of antibacterial PET-based hollow fibers containing silver particles. *Materials Letters* 65: 1375-1377.
- Lockhart H.B. (1983). Silver compounds. *In: Encyclopedia of chemical technology*. 3<sup>ème</sup> édition. New York : John Wiley et Sons. pp 16-32.
- Loschner K., Hadrup N., Qvortrup K., Larsen A., Gao X., Vogel U., Martensen A., Lam H.R., Larsen E.H. (2011). Distribution of silver in rats following 28 days of repeated oral exposure to silver nanoparticles or silver acetate. *Part Fibre Toxicol*. 8:18.
- Lu S.C. (2013). Glutathione synthesis. *Biochim Biophys Acta*. 1830(5): 3143-3153.
- Lyoumi S., Tamion F., Leplingard A., Beaumont C., Puy H., Lebreton J-P. (2007). Rôles protecteur de l'hème oxygénase et des catabolites de l'hème. *Hématologie* 13(4): 251-65.

### M

- Magnin P. (1992). Les vitamines. *Que Sais-je?*. 1<sup>ère</sup> édition. Paris. 127 p.
- Makar T.K., Nedergaard M., Preuss A., Gelbard A.S., Perumal A.S., Cooper A.J.L. (1994). Vitamin E, ascorbate, glutathione, glutathione disulfide, and enzymes of glutathione metabolism in cultures of chick astrocytes and neurons: evidence that

astrocytes play an important role in antioxidative processes in the brain. *J Neurochem.* 62: 45-53.

- Massarsky A., Streck L., Craig P.M., Eisa-Beygi S., Trudeau V.L., Moon T.W. (2014). Acute embryonic exposure to nanosilver or silver ion does not disrupt the stress response in zebrafish (*Danio rerio*) larvae and adults. *Science of the Total Environment* 78: 133-140.
- Matuk Y., Ghosh M., McCulloch C. (1981). Distribution of silver in the eyes and plasma proteins of the albino rat. *Can. J. Ophthalmol.* 16(3): 145-150.
- Mayr M., Kim M.J., Wanner D., Helmst H., Schroeder J., Minatsch M.J. (2009). Argynria and decreased kidney function: Are silver compounds toxic to the kidney ?. *Kidney biopsy teaching case. American journal of kidney diseases* 53(5): 890-894.
- McNeely M. (1984). Lipase. *In: Kaplan A. et al. Clin Chem The C.V. Mosby Co. St Louis. Toronto. Princeton.* 1130-1134. 892.
- Meittini F. Prencipe L., Bardelli F., Giannini G., Tarli P. (1978). The 4-hydroxybenzoate/4-aminophenazone Chromogenic System. *Clin Chem.* 24(12): 2161-2165.
- Memisogullari R., Gumustekink K., Dane S. Akcay F. (2006). The Effect of pre-injury supplementation with selenium or vitamin E on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in burn injury. *Turk J Med Sci.* 36(3): 141-146.
- Migliore L., Coppede F. (2009). Environmental induced oxidative stress in neurodegenerative disorders and aging. *Mutation Research* 674: 73-94.
- Miresmaeili S.M., Halvaei I., Fesahat F., Fallah A., Nikonahad N., Taherinejad M. (2013). Evaluating the role of silver nanoparticles on acrosomal reaction and spermatogenic cells in rat. *Iran J Reprod. Med.* 11: 423-30.
- Mirsattari S.M., Hammond R.R., Sharpe M.D., Leung F.Y., Young G.B. (2004). Myoclonic status epilepticus following repeated oral ingestion of colloidal silver. *Neurology* 62(8): 1408-1410.
- Misra H.P., Fridovich I. (1977). Superoxide dismutase: "positive" spectrophotometric assays. *Anal. Biochem.* 79(1-2): 553-560.
- Miura N., Shinohara Y. (2009). Cytotoxic effect and apoptosis induction by silver nanoparticles in Hela cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 390: 733-737.

- Morel Y., Barouki R. (1998). Influence du stress oxydant sur la régulation des gènes. *Médecine/sciences. Synthèse* 14: 713-21.
- Morère J-L., Pujol R. (2003). *Dictionnaire raisonné de Biologie*. Paris : Éd Frison-Roche. 1300 p.
- Moss A.P., Sugar A., Hargett N.A., Atkin A., Wolkstein M., Rosenman K.D. (1979). The ocular manifestations and functional effects of occupational argyrosis. *Arch. Ophthalmol.* 97: 906–908.
- Muller D.P.R., Goss-Sampson M.A. (1990). Neurochemical, neurophysiological, and neuro-pathological studies in vitamin E deficiency. *Crit Rev Neurobiol.* 5: 239-63.
- Munger M.A., Radwanski P., Pharm D., Greg C., Hadlock D., Greg S., Shaaban A., Falconer J., Grainger D.W., Cassandra E. *et al.* (2014). In vivo human time-exposure study of orally dosed commercial silver nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* 10: 1-9.

### N

- Nair P.M.G., Park S.Y., Choi J. (2013). Evaluation of the effect of silver nanoparticles and silver ions using stress responsive gene expression in *Chironomus riparius*. *Chemosphere* 92: 592-599.
- Newton D., Holmes A. (1966). A case of accidental inhalation of zinc-65 and silver – 110 m. *Radiation Research* 29(3): 403-412.
- Nicoteria P., Orrenius S. (1986). Role of thiols in protection against biological reactive intermediates. *In: J.J. Kocsis, J.D. Jollow, C.M. Witmer, J.O. Nelson. Biological Reactive Intermedites. Vol 3. New York : Éd R.Snyder. Plenum. pp 45-51.*
- Norgaard O. (1954). Investigations with radioactive 111 Ag into resorption of silver through human skin. *Acta Dermato-Venerologica* 34: 415-419.
- Niki E. (2010). Assessment of antioxidant capacity *in vitro* and *in vivo*. *Free Radical Biology & Medicine* 49: 503-515.

### O

- Ognjanovic B.I., Pavlovic S.Z., Maletic S.D., Zikic R.V., Stajn A.S., Radojicic R.M., Saicic Z.S., Petrovic V.M. (2003). Protective influence of vitamin E on antioxidant defense system in the blood of rats treated with cadmium. *Physiol. Res.* 52: 563-570.

- Ohbo Y., Fukuzako H., Takeuchi K., Takigawa M. (1996). Argiria and convulsive seizures caused by ingestion of silver in a patient with schizophrenia. *Psychiatry and Clinical Neurosciences* 50: 89-90.
- Olcott C.T. (1950). Experimental argyrosis. 5, Hypertrophy of the left ventricle of the heart in rats ingesting silver salts. *Arch. Pathol.* 49(2):138-149.
- Otitoju O., Onwurah I.N.E., Otitoju G.T.O., Ugwu C.E. (2008). Oxidative stress and superoxide dismutase activity in brain of rats fed with diet containing permethrin. *Biokemistri* 20: 93-98.
- Otten J.J., Hellwig J.P., Meyers D.M. (2006). *Dietary reference intakes: the essential guide to nutrient requirements*. Washington, DC: The National Academies Press.

### P

- Park E.J., Bae E., Yi J., Kim Y., Choi K., Lee S.H., Yoon J., Lee B.C., Park K. (2010). Repeated dose toxicity and inflammatory responses in mice by oral administration of silver nanoparticles. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 30: 162-168.
- Park H.J., Kim J.Y., Ki J., Lee J.H., Hahn J.S., Gu. M.B., Yoon J. (2009). Silver-ion-mediated reactive species generation affecting bactericidal activity. *Water Research* 43: 1027-1032.
- Pastore A., Federici G., Bertini E., Piemonte F. (2003). Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clin. Chim. Acta.* 333(1): 19-39.
- Pelkonen K.H.O., Heinonen-Tansk H., Hänninen O.O.P. (2003). Accumulation of Silver from drinking water into cerebellum and musculus soleus in mice. *Toxicology* 186: 151-157.
- Pelmont J. (2008). *Glossaire de Biochimie environnementale*. 1<sup>ère</sup> édition. Grenoble : EDP Sciences. 1026 p.
- Peterson R.P., Jensen L.S., Harrison P.C. (1973). Effect of silver-induced enlarged hearts during the first 4 weeks of life on subsequent performance of turkeys. *Avian Dis.* 17(4): 802-806.
- Phalen R.F., Morrow P.E. (1973). Experimental inhalation of metallic silver. *Health phys.* 24: 509-518.
- Pifer J.W., Friedlander B.R., Kintz R.T. *et al.* (1989). Absence of toxic effects in silver reclamation workers. *Scand J Work Environ Health.* 15: 210-21.

- Pincemail J., Defraigne J.O., Meurisse M., Limet R. (1998). Antioxydants et prévention des maladies cardiovasculaires 2<sup>ème</sup> partie: la vitamine E. MS. 90.
- Pincemail J., Nève J., Defraigne J.O., Meurisse M., Limet R (1999). Antioxydants et prévention des maladies cardiovasculaires. 4<sup>ème</sup> partie: le sélénium. MS. 93.
- Pincemail J., Limet R., Defraigne J-O. (2001). Stress oxydant et transmission cellulaire: implication dans le développement du cancer. MS. 134.
- Pincemail J., Bonjean K., Cayeux K., Defraigne J-O. (2002). Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante. Nutrition clinique et métabolisme 16: 233-239.
- Poisson C. (2013). Rôle du stress oxydant au niveau hépatique et rénal dans la toxicité de l'uranium après exposition chronique. Thèse de doctorat en toxicologie. Paris : Université Paris-Sud 11. 416 p. Disponible sur :  
«<http://www.irsn.fr/EN/Research/Theses-post-docs/Theses/Defended-thesis/DRPH/Documents/2013-These-Poisson.pdf>» [consulté Mars 2016]
- Powers C.M., Wrench N., Ryde I.T., Smith A.M., Seidler F.J., Slotkin T.A. (2010). Silver Impairs Neurodevelopment: Studies in PC12 Cells. Environmental Health Perspectives 118: 73-79.

### Q

- Qingzhi W., Kaixun H., Huibi X. (2003). Effects of long-term selenium deficiency on glutathione peroxidase and thioredoxin reductase activities and expressions in rat aorta. Inorganic Biochemistry 94(4): 301-306.

### R

- Reichl F-X., Benecke M., Benecke J., Eckert K-G., Erber B., Golly I.C., Kreppel H., Liebl B., Mückter H., Szinicz L. *et al.* (2004). Guide pratique de toxicologie. 1<sup>ère</sup> édition. Bruxelles : Éd de Boeck Université. p 348.
- Reid M.E., Duffield-Lillico A.J., Slate E., Natarajan N., Turnbull B., Jacobs E., Combs G.F.Jr., Alberts D.S., Clark L.C., Marshall J.R. (2008). The nutritional prevention of cancer: 400 mcg per day selenium treatment. Nutr Cancer. 60(2): 155–63.
- Reiter R., Wendel A. (1983). Selenium and drug metabolism. Multiple modulations of mouse liver enzymes. Biochem Pharmacol. 32: 3063-3067.
- Riberio F., Gallergo-Urrea J.A., Jurkschat K., Crossley A., Hassellöv M., Taylor C., Soares A.M.V.M., Loureiro S. (2014). Silver nanoparticles and silver nitrate induce

high toxicity to *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Daphnia magna* and *Danio rerio*. *Sci Total Environ.* 466-467:232-41.

- Ricciarelli R., Zing J.M., Azzi A. (2002). The 80 h anniversary of vitamin E: beyond its antioxidant properties. *Biol Chem.* 383: 457-65.
- Ricetti M.M., Guidi G.C., Tecchio C., Bellisola G., Rigo A., Perona G. (1999). Effects of sodium selenite on in vitro interactions between platelets and endothelial cells. *Int J Clin Lab Res.* 29(2): 80–4.
- Ridlington J.W., Whanger P.D. (1981). Interactions of selenium and antioxidants with mercury, cadmium and silver. *Fundamental and applied toxicology* 1: 368-375.
- Rosenman K.D., Moss A., Kon S. (1979). Argyria: Clinical implications of exposure to silver nitrate and silver oxide. *J. Occup. Med.* 21: 430.
- Rosenman K.D., Seiscas N., Jacobs I. (1987). Potential nephrotoxic effects of exposure to silver. *British journal of Industrial Medicine* 44: 267-272.
- Rungby J. (1986). Experimental argyrosis: ultrastructural localization of silver in rat eye. *Experimental and molecular pathology* 45: 22-30.
- Rungby J. (1987). Silver induced lipid peroxidation in mice: Interaction with selenium and nickel. *Toxicology* 45: 135-142.
- Rungby J., Danscher G. (1983). Localization of exogenous silver in brain and spinal cord of silver exposed rats. *Acta Neuropathol.* 60: 92–98.
- Rungby J., Danscher G. (1984). Hypoactivity in silver exposed mice. *Act pharmacol. Et toxicol.* 55: 398-401.
- Rungby J., Slomianka L., Danscher G., Andersen A.H., West M.J. (1987). A quantitative evaluation of the neurotoxic effect of silver on the volumes of the components of the developing rat hippocampus. *Toxicology* 43: 261-268.

### S

- Sachdeva R., Thomas B., Wang X., Ma J., Jones K.H., Hatcher P.G., Cornwell D.G. (2005). Tocopherol metabolism using thermochemolysis. Chemical and Biological properties of  $\gamma$ -tocopherol,  $\gamma$ -carboxyethyl-hydroxychroman, and their quinones. *Chem. Res. Toxicol.* 18(6): 1018–1025.
- Santhosh Kumar B., Priyadarsini K.I. (2014). Selenium nutrition: How important is it?. *Bio-medicine and Preventive nutrition* 4: 333-341.

- Sapra K., Sapra A. (2014). Argyria: the blue skin rare disease. *Asian Pac. J. Health Sci.* 1(3): 193-196.
- Sarhan O.M.M., Hussein R.M. (2014). Effects of intraperitoneally injected silver nanoparticles on histological structures and blood parameters in the albino rat. *International Journal of Nanomedicine* 9: 1505–1517.
- Schlotzer-Schrehardt U., Holbach L.M., Homann-Rummelt C., Naumann G.O. (2001). Multifocal corneal argyrosis after explosion injury. *Cornea* 20: 553.
- Schrauben S.J., Bhanusali D.G., Sheets S., Sinha A.A. (2012). A case of argyria: multiple forms of silver ingestion in a patient with comorbid schizo affective disorder. *Cutis.* 89: 221-224.
- Schwarz K., Foltz C.M. (1958). Factor 3 activity of selenium compounds. *J Biol Chem.* 233(1): 245–51.
- Seifried H.E., Anderson D.E., Fisher E.I., Milner J.A. (2007). A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. *Journal of Nutritional Biochemistry* 18: 567-579.
- Serafin Muñoz A H., Wrobel K., Gutierrez Corona J. F., Wrobel K. (2007). The protective effect of selenium inorganic forms against cadmium and silver toxicity in mycelia of *Pleurotus ostreatus*. *Mycological research* 111(5): 626-632.
- Shargorodsky M., Debby O., Matas Z., Zimlichman R. (2010). Effect of long-term treatment with antioxidants (vitamin C, vitamin E, coenzyme Q10 and selenium) on arterial compliance, humoral factors and inflammatory markers in patients with multiple cardiovascular risk factors. *Nutr Metab.* 7:55.
- Sharma D.C., Sharma P., Sharma S. (1997). Effect of silver leaf on circulating lipids and cardiac and hepatic enzymes. *Indian J Physical Pharmacol.* 41(3): 285-288.
- Sharma V.K., Siskova K.M., Zboril R., Gardea-Torresdey J.L. (2014). Organic-coated silver nanoparticles in biological and environmental conditions: Fate, stability and toxicity. *Advances in Colloid and Interface Science* 204: 15-34.
- Shavlovski M.M., Chebotar N.A., Konopisteva L.A., Gaitskhoki V.S. (1995). Embryotoxicity of silver ions is diminished by ceruloplasmin - Further evidence for its role in the transport of copper. *BioMetals* 8(2): 122-8.
- Sheehan D., Meade G., Foley V. M., Dowd C. A. (2001). Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochem. J.* 360: 1–16.

- Sies H. (1991). Oxidative stress: introduction. *In*: Sies H., editor. Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants. New York : Academic Press. pp xv–xxii.
- Sinha A.K. (1972). Colorimetric assay of catalase. *Analytical Biochemistry* 47: 389-394.
- Smith I.C., Carson B.L. (1977). Trace metals in the environment-2: Silver. 1<sup>st</sup> edition. Michiganan : Ann Arbor Science Publishers. 469 p.
- Sochor J., Pohanka M., Ruttkay-Nedecky B., Zitka O., Hynek D., Mares P., Zeman L., Adam V., Kizek R. (2012). Effect of selenium in organic and inorganic form on liver, kidney, brain and muscle of Wistar rats. *Cent. Eur. J. Chem.* 10(5): 1442-1451.
- Steinbrenner H., Speckmann B., Pinto A., Sies H. (2011). High selenium intake and increased diabetes risk: experimental evidence for interplay between selenium and carbohydrate metabolism. *J Clin Biochem Nutr.* 48(1): 40-5.
- Sterling J.P. (2014). Silver – resistance, allergy, and blue skin: Truth or urban legend. *burns* 40 Suppl 1: S19-23.
- Strauch B., Buch W., Grey W., Laub D. (1969). Successful treatment of methemoglobinemia secondary to silver nitrate therapy. *N Engl J Med.* 281:257-288.
- Sun H.J., Rathinasabapathi B., Wu B., Luo J., Pu L-P., Ma L.Q. (2014). Arsenic and selenium toxicity and their interactive effects in humans. *Environment International* 69: 148-158.

### T

- Taille C., El Benna J., Lanone S., Dang M.C., Ogier-Denis E., Aubier M., Boczkowski J. (2004). Induction of Heme Oxygenase-1 inhibits NAD(P)H oxidase activity by down-regulating cytochrome b558 expression via the reduction of heme availability. *J. Biol. Chem.* 279: 28681-28688.
- Tamimi S.O., Zneili S.M., Gharaibeh M.N., Shubair M.S.Salhab A.S (1998). Toxicity of a new antismoking mouthwash 881, 010 in rats and rabbits. *J. Toxicol. Environ. Health A.* 53(1): 47-60.
- Teodo J.S., Simões A.M., Duarte F.V., Rolo A.P., Murdoch R.C., Hussain S.M., Palmeira C.M. (2011). Assessment of the toxicity of Silver nanoparticles in vitro: A mitochondrial perspective. *Toxicology in vitro* 25: 664-670.
- Tietz N.W. (1990). *Clinical Guide to Laboratory Tests*. 2<sup>nd</sup> edition. Philadelphia : Pa WB Saunders. pp 246-250.

### U

- Upreti K.K., Das M., Kuman A., Singh G.B., Khanna S.K. (1989). Biochemical toxicology of argemone oil. IV: Short-term oral feeding response in rats. *Toxicology* 58: 285-9.
- Ursini F., Heim S., Kiess M., Maiorino M., Roveri A., Wissing J., Flohé L. (1999). Dual function of the selenoprotein PHGPx during sperm maturation. *Science* 285 (5432):1393–6.
- U.S. PHS. (1990). Toxicological profile for silver. U.S. Public Health Services. Agency for toxic substances and disease registry. Atlanta.

### V

- Vadhanavikit S., Canther H.E. (1990). Effects of selenium depletion and repletion on hepatic 5'deiodmase (type 1), glutathione-Stransferase, and glutathione peroxydase in the rat. *FASEB*. 4: A37.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M. and Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem. Cell. Biol.* 39(1): 44-84.
- Van Der Zande M., Vanderbriel R.J., Van Doren E., Kramer E., Rivera Z.H., Serrano-Rojero C.S., Gremmer E.R., Mast.J., Peters R.J.B., Hollman P.C.H. *et al.* (2012). Distribution, elimination, andtoxicity of silver nanoparticles and silver ions in rats after 28-dayoral exposure. *American Chemical Society* 6(8): 7427-7442.

### W

- Walker F. (1971). Experimental argyria: a model for basement membrane studies. *Br. J. Exp. Pathol.* 52(6): 589-593.
- Walker F. (1972). The deposition of silver in glomerular basement membrane. *Virchows Arch. B Cell Pathol.* 90-96.
- Wan A.T., Conyers R.A.J., Coombs C.J., Masterton J.P. (1991). Determination of silver in blood, urine and tissues of volunteers and burn patients. *Clin. Chem.* 37: 1683.
- Wang Y., Hwang D.C., Licing B., Watson R.R. (1994<sup>a</sup>). Nutritional status and immune responses in mice with murine AIDS are normalized by vitamin E supplementation. *J Nutr.* 124: 2024-32.

- Wang Y., Huang D.S., Eskelson C.D., Watson R.R. (1994<sup>b</sup>). Long-term dietary vitamin E retards development of retrovirus-induced dysregulation in cytokine production. *Clin Immunol Immunopathol.* 72: 70-5.
- Watts D.L. (1994). The Nutritional Relationships of Selenium. *Journal of Orthomolecular Medicine* 9(2): 111-117.
- Weiyang C.M., Nelson V.M., Jiang Z.G., Lebowitz M.S., Ghanbari H.A. (2009). A novel neuroprotectant PAN-811 protects neurons from oxidative stress. *Central European Journal of Biology* 4: 34-40.
- Who (World Health Organization). (1996). Silver. Guidelines for Drinking water Quality. Vol 2. Geneva. pp 338-343.
- Who. (2002). Silver and Silver compounds: environmental aspects. Concises International Chemical Assessment Document 44. Genève.
- Wijnhoven S.W.P., Peljnenburg W.J.G.M., Herbets C.A., Hagens W.I., Oomen A.G., Heugens E.H.W., Moszek B., Bisschops J., Gosens I., De Meent B.R. *et al.* (2009). Nanosilver : a review of available data and knowledge gaps in human and environmental risk assessment. *Nanotoxicology* 3: 109-138.
- Wright J.B., Lam K., Burell R.E. (1998). Wound management in a area of increasing bacterial antibiotic resistance: Arole for topical silver treatment. *AJIC.* 26(6): 572-577.
- Wu D., Meydani M., Beharka A.A., Serafini M., Martin K.R., Meydani S.N. (2000). In vitro supplementation with different tocopherol homologues can affect the function of immune cells in old mice. *Free Rad Biol Med.* 28: 643-51.
- Wu X., Bishopric N., Disher D., Murphy B., Webster K. (1996). Physical and functional sensitivity of zinc-finger transcription factor to redox changes. *Mol Cell Biol.* 16:1035-46.

### Y

- Yin N., Yao X., Zhou Q., Faiola F., Jiang G. (2015). Vitamin E attenuates silver nanoparticle-induced effects on body weight and neurotoxicity in rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 458(2): 405-10.
- Ying Foo A. *et al.* (1998). Amylase measurement with 2-chloro-4nitrophenyl maltrotrioside as substrate. *Clin Chem.* 272: 137-147.
- Young D.S. (1995). Effect of Drugs on Clinical laboratory Tests. 4<sup>th</sup> Ed AACC Press. P.3-26 à 3-35.

### *Z*

- Zhu B., Pennack J.A., McQuilton P., Forero M.G., Mizuguchi K., Sutcliffe B., Gu C.J., Fenton J.C., Hidalgo A. (2008). *Drosophila* neurotrophins reveal a common mechanism for nervous system formation. *PLoS Biol.* 6(11): e284.
- Zikic R.V., Stajn A., Ognjanovic B., Pavlovic S.Z., Kostic M.M. (1995). The effects of cadmium and selenium on the ascorbic acid and vitamin E contents in the plasma and liver of young and adult rats. *Coll Sci. Pap Fac. Sci. Krag.* 17: 203-213.

***A.N.NEXES***

## 1. Réactifs et procédures utilisés dans les dosages biochimiques

### 1.1. Dosage de la glycémie

- **Echantillon:** sérum.

#### 1.1.1. Réactifs

<b>Réactif 1a</b>	Tampon	
	Tampon phosphate	0.1 mol/l, pH 7.0
	Phénol	11 mmol/L

<b>Réactif 1b</b>	GOD-PAP	
	4- amino-antipyrine	0.77 mmol/l
	GOD	≥ 1.5 KU/l
	POD	≥ 1.5 KU/l

<b>Calibrant</b> (standard)		
	Glucose	0.1 g/dl

- ✓ **Réactif de travail:** dissoudre le contenu de réactif 1b dans le flacon de réactif 1a et mélanger légèrement. Ce réactif de travail est stable un mois à 2-8 °C, ou 7 jours à 15-25 ou 37 °C.

#### 1.1.2. Mode opératoire

	Standard ou échantillon	Blanc
Echantillon/standard	0.01 ml	0 ml
Réactif de travail	1.00 ml	1.00 ml

- ✓ Mélanger, incuber pendant 25 min à 15-25 °C ou 10 min à 37 °C.
- ✓ Lire la densité optique (DO) à 500 nm.

#### 1.1.3. Calcul de concentrations

$$\text{Glucose (g/dl)} = \frac{\text{DO échantillon}}{\text{DO standard}} \times [\text{Standard}] (0.1 \text{ g/dl})$$

## 1.2. Dosage de l'ASAT

- **Echantillon:** sérum.

#### 1.2.1. Réactifs

<b>Réactif 1</b>	Tampon	
	TRIS	80 mmol/L, pH 7.8
	L-Aspartate	200 mmol/l

<b>Réactif 2</b>	NADH	0.18 mmol/l
	LDH	800 U/l
	MDH	600 U/l
	α-Cétoglutarate	12 mmol/l

- ✓ **Réactif de travail:** dissoudre un comprimé de R2 dans un flacon de R1. Ce réactif est stable 21 jours à 2-8 °C ou 72 heures à 15-25 °C.

### 1.2.2. Mode opératoire

<b>Réactif de travail</b>	1.0 ml
<b>Echantillon</b>	100 µl

- ✓ Mélanger, incubé pendant 1 min.
- ✓ Lire la densité optique initiale (DO1), ensuite la DO2, DO3 et DO4 avec un intervalle d'une minute entre chaque lecture à 340 nm.
- ✓ Calculer la différence entre les DO et la moyenne  $\Delta DO/min$ .

### 1.2.3. Calcul de l'activité enzymatique

$$ASAT (U/L) = \Delta DO/min \times 1750$$

## 1.3. Dosage de l'ALAT

- **Echantillon:** sérum.

### 1.3.1. Réactifs

<b>Réactif 1</b>	Tampon TRIS L-Alanine	100 mmol/L, pH 7.8 500 mmol/L
<b>Réactif 2</b>	NADH LDH $\alpha$ -Cétoglutarate	0.18 mmol/L 1200 U/L 15 mmol/L

- ✓ **Réactif de travail:** dissoudre un comprimé de R2 dans un flacon de R1. Ce réactif est stable 21 jours à 2-8 °C ou 72 heures à 15-25 °C.

### 1.3.2. Mode opératoire

<b>Réactif de travail</b>	1.0 ml
<b>Echantillon</b>	100 µl

- ✓ Mélanger, incubé pendant une minute.
- ✓ Lire la densité optique initiale (DO1), ensuite la DO2, DO3 et DO4 avec un intervalle d'une minute entre chaque lecture à 340 nm.
- ✓ Calculer la différence entre les DO et la moyenne  $\Delta DO/min$ .

### 1.3.3. Calcul de l'activité enzymatique

$$ALAT (U/L) = \Delta DO/min \times 1750$$

## 1.4. Dosage de LDH

- **Echantillon:** sérum.

### 1.4.1. Réactifs

<b>Réactif 1</b>	Tampon Imidazole Pyruvate	65 mmol/l 0.6 mmol/l
<b>Réactif 2</b>	NADH	0.18 mmol/l

- ✓ **Réactif de travail:** dissoudre un comprimé de R2 dans un flacon de R1. Ce réactif est stable 2 jours à 2-8 °C ou 12 heures à 15-25 °C.

#### 1.4.2. Mode opératoire

	25 - 30 °C	37 °C
<b>Réactif de travail (ml)</b>	3.0	3.0
<b>Echantillon (µl)</b>	100	50

- ✓ Mélanger, incuber pendant une minute.
- ✓ Lire la densité optique initiale (DO1), ensuite la DO2, DO3 et DO4 avec un intervalle d'une minute entre chaque lecture à 340 nm.
- ✓ Calculer la différence entre les DO et la moyenne  $\Delta DO/min$ .

#### 1.4.3. Calcul de l'activité enzymatique

$$LDH (U/L) = \Delta DO/min \times 4925 (25 - 30^\circ C)$$

$$LDH (U/L) = \Delta DO/min \times 9690 (37^\circ C)$$

#### 1.5. Dosage de PAL

- **Echantillon:** sérum.

##### 1.5.1. Réactifs

<b>Réactif 1</b>	Diéthanolamine	1 mmol/l, pH 10.4
<b>Tampon</b>	Chlorure de magnésium	0.5 mmol/l
<b>Réactif 2</b>	p-Nitrophénylphosphate	10 mmol/l
<b>Substrat</b>		

- ✓ **Réactif de travail:** dissoudre un comprimé de substrat R2 dans 15 ml de tampon R1. Ce réactif est stable 21 jours à 2-8 °C ou 5 jours à 15-25 °C.

#### 1.5.2. Mode opératoire

<b>Réactif de travail</b>	1.2 ml
<b>Echantillon</b>	20 µl

- ✓ Mélanger, incuber pendant une minute.
- ✓ Lire la densité optique initiale (DO1), ensuite la DO2, DO3 et DO4 avec un intervalle d'une minute entre chaque lecture à 405 nm.
- ✓ Calculer la différence entre les DO et la moyenne  $\Delta DO/min$ .

#### 1.5.3. Calcul de l'activité enzymatique

$$PAL (U/L) = \Delta DO/min \times 3300$$

#### 1.6. Dosage de la bilirubine directe

- **Echantillon:** sérum.

### 1.6.1. Réactifs

#### Réactif 1

Acide sulfanilique	30 mmol/l
Acide chlorhydrique	150 mmol/l

<b>Réactif 2</b> Nitrite de sodium	29 mmol/l
------------------------------------	-----------

<b>Calibrant</b> (Standard) Bilirubine	Réf: 1002250
---	--------------

### 1.6.2. Mode opératoire

	Blanc	Bilirubine directe
<b>R1 (ml)</b>	1.5	1.5
<b>R2 (µl)</b>	50	50
<b>Echantillon/Calibrant (µl)</b>	/	100

✓ Mélanger, incubé pendant 5 min.

✓ Lire la DO à 555 nm

### 1.6.3. Calcul de concentrations

$$\text{Bilirubine directe (mg/dl)} = \frac{\text{DO échantillon} - \text{DO blanc échantillon}}{\text{DO calibrant} - \text{DO blanc calibrant}} \times \text{concentration de calibrant}$$

## 1.7. Dosage des protéines totales

➤ **Echantillon:** sérum.

### 1.7.1. Réactifs

<b>Réactif</b> Tartrate-Na-K	15 mmol/l
<b>Biuret</b> Iodure de sodium	100 mmol/l
Iodure de potassium	5 mmol/l
Sulfate de cuivre	19 mmol/l

<b>Calibrant</b> <b>Protéines totales</b> Albumine bovine (Standard)	7 g/dl
---	--------

### 1.7.2. Mode opératoire

	Blanc	Standard	Echantillon
<b>R (ml)</b>	1.0	1.0	1.0
<b>Standard (µl)</b>	/	25	/
<b>Echantillon (µl)</b>	/	/	25

✓ Mélanger, incubé pendant 5 min à 37 °C ou 10 min à température ambiante.

✓ Lire l'absorbance de l'échantillon et de standard, contre le blanc. La couleur est stable 30 min.

### 1.7.3. Calcul de concentrations

$$\text{Protéines totales (g/dl)} = \frac{\text{DO échantillon}}{\text{DO standard}} \times \text{concentration de standard (7 g/dl)}$$

### 1.8. Dosage d'albumine

- **Echantillon:** sérum.

#### 1.8.1. Réactifs

<b>Réactif</b>	Vert de Bromocrésol	0.12 mmol/l, pH 4.2
<b>Calibrant</b>	Solution d'albumine (Standard)	5 g/dl
<b>Protéines totales</b>		

#### 1.8.2. Mode opératoire

	Blanc	Etalon	Essai
<b>R (ml)</b>	1.0	1.0	1.0
<b>Standard (µl)</b>	/	5	/
<b>Echantillon (µl)</b>	/	/	5

- ✓ Mélanger, incuber pendant 10 min à température ambiante (15-25 °C).
- ✓ Lire l'absorbance de l'échantillon et de standard, contre le blanc. La couleur est stable 1 h à température ambiante.

### 1.8.3. Calcul de concentrations

$$\text{Albumine (g/dl)} = \frac{\text{DO échantillon}}{\text{DO standard}} \times \text{concentration de standard (5 g/dl)}$$

### 1.9. Dosage du cholestérol

- **Echantillon:** sérum.

#### 1.9.1. Réactifs

<b>Réactif 1</b>	Tampon PIPES Phénol	90 mmol/l, pH 6.9 26 mmol/l
<b>Réactif 2</b>	Enzymes CHE CHOD POD 4-Aminophénazone	300 U/l 300 U/l 1200 U/l 0.4 mmol/l
<b>Calibrant</b>	Cholestérol (Standard)	200 mg/dl

- ✓ **Réactif de travail:** dissoudre le contenu de réactif R2 dans le flacon R1. Ce réactif est stable 4 mois à 2-8 °C ou 40 jours à 15-25 °C.

### 1.9.2. Mode opératoire

	Blanc	Etalon	Essai
<b>R (ml)</b>	1.0	1.0	1.0
<b>Standard (µl)</b>	/	10	/
<b>Echantillon (µl)</b>	/	/	10

- ✓ Mélanger, incuber pendant 5 min à 37 °C ou 10 min à température ambiante (15-25 °C).
- ✓ Lire l'absorbance de l'échantillon et de standard, contre le blanc. La couleur est stable 60 min.

### 1.9.3. Calcul de concentrations

$$\text{Cholestérol (mg/dl)} = \frac{\text{DO échantillon}}{\text{DO standard}} \times \text{concentration de standard (200 mg/dl)}$$

### 1.10. Dosage des triglycérides

- **Echantillon:** sérum.

#### 1.10.1. Réactifs

<b>Réactif 1</b>	Tampon GOOD p-Chlorophénol	50 mmol/l, pH 7.5 2 mmol/l
<b>Réactif 2</b>	Enzymes LPL Glycérol kinase GPO 4-Aminophénazone ATP	150000 U/l 500 U/l 2500 U/l 0.1 mmol/l 0.1 mmol/l
<b>Calibrant</b>	Triglycérides (Standard)	200 mg/dl

- ✓ **Réactif de travail:** dissoudre le contenu de réactif R2 dans le flacon R1. Ce réactif est stable 6 semaines à 2-8 °C ou 1 semaine à 15-25 °C.

#### 1.10.2. Mode opératoire

	Blanc	Etalon	Essai
<b>R (ml)</b>	1.0	1.0	1.0
<b>Standard (µl)</b>	/	10	/
<b>Echantillon (µl)</b>	/	/	10

- ✓ Mélanger, incuber pendant 5 min à 37 °C ou 10 min à température ambiante.
- ✓ Lire l'absorbance de l'échantillon et de standard, contre le blanc. La couleur est stable 30 min.

### 1.10.3. Calcul de concentrations

$$\text{Triglycérides (mg/dl)} = \frac{\text{DO échantillon}}{\text{DO standard}} \times \text{concentration de standard (200 mg/dl)}$$

### 1.11. Dosage des lipides totaux

- **Echantillon:** sérum.

#### 1.11.1. Réactifs

**Réactif**      Phosphovanilline      235 mmol/l

<b>Calibrant</b>		
<b>Lipides totaux</b>	Lipides totaux (Standard)	750 mg/dl

#### Acide sulfurique

#### 1.11.2. Mode opératoire

	Etalon	Essai
<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (ml)</b>	2.5	2.5
<b>Standard (µl)</b>	100	/
<b>Echantillon (µl)</b>	/	10

- ✓ Agiter.
- ✓ Incuber pendant 10 min dans un bain marie (100 °C).

	Blanc	Etalon	Essai
<b>R (ml)</b>	1.0	1.0	1.0
<b>Standard (µl)</b>	/	50	/
<b>Echantillon digéré par l'acide (µl)</b>	/	/	50

- ✓ Agiter.
- ✓ Incuber pendant 15 min à 37 °C.
- ✓ Lire l'absorbance de l'échantillon et de standard, contre le blanc. La couleur est stable 1 h.

### 1.11.3. Calcul de concentrations

$$\text{Lipides totaux (mg/dl)} = \frac{\text{DO échantillon}}{\text{DO standard}} \times \text{concentration de standard (750 mg/dl)}$$

### 1.12. Dosage de créatinine

- **Echantillon:** sérum.

### 1.12.1. Réactifs

<b>Réactif</b>	Acide picrique	17.5 mmol/l
<b>Réactif 2</b>	Hydroxyde de sodium	0.29 mol/l
<b>Calibrant</b> (Standard)	Créatinine	2 mg/dl

- ✓ **Réactif de travail:** mélanger les mêmes volumes des 2 réactifs R1 et R2. Ce réactif est stable 10 jours à 15-25 °C.

### 1.12.2. Mode opératoire

	Blanc	Etalon	Essai
<b>R (ml)</b>	1.0	1.0	1.0
<b>Standard (µl)</b>	/	100	/
<b>Echantillon (µl)</b>	/	/	100

- ✓ Mélanger.
- ✓ Lire l'absorbance ( $A_1$ ) après 30 sec et après 90 sec d'ajout d'échantillon lire l'absorbance ( $A_2$ ).
- ✓ Calculer  $\Delta A = A_2 - A_1$ .

### 1.12.3. Calcul de concentrations

$$\text{Créatinine (mg/dl)} = \frac{\text{DO échantillon}}{\text{DO standard}} \times \text{concentration de standard (2 mg/dl)}$$

## 1.13. Dosage de l'urée

- **Echantillon:** sérum.

### 1.13.1. Réactifs

<b>Réactif 1</b>	Tampon	
	Phosphate	50 mmol/l, pH 6.7
	EDTA	2 mmol/l
	Salicylate	400 mmol/l
	Nitroprussiate	10 mmol/l
<b>Réactif 2</b>	Enzymes	
	Uréase	3000 U/l
<b>Réactif 3</b>	Réactif alcalin	
	Sodium hypochlorite	140 mmol/l
	Hydroxyde de sodium	150 mmol/l
<b>Calibrant</b>	Urée (Standard)	50 mg/dl

- ✓ **Réactif de travail:** dissoudre un comprimé de R2 dans un flacon de R1 et mélanger légèrement.

## 1.13.2. Mode opératoire

	Blanc	Etalon	Essai
R (ml)	1.0	1.0	1.0
Standard (µl)	/	10	/
Echantillon (µl)	/	/	10

✓ Mélanger et incuber 5 min à 37 °C ou 10 min à température ambiante (15-25°C).

	Blanc	Standard	Echantillon
R3 (ml)	1.0	1.0	1.0

✓ Mélanger et incuber 5 min à 37 °C ou 10 min à température ambiante (15-25°C).

✓ Lire les absorbances à 580 nm contre le blanc. La couleur est stable 30 min.

## 1.13.3. Calcul de concentrations

$$\text{Urée (mg/dl)} = \frac{\text{DO échantillon}}{\text{DO standard}} \times \text{concentration de standard (50 mg/dl)}$$

## 1.14. Dosage de l'acide urique

➤ **Echantillon:** sérum.

## 1.14.1. Réactifs

<b>Réactif 1</b>	Tampon Phosphate DCPS	50 mmol/l, pH 7.4 4 mmol/l
<b>Réactif 2</b>	Enzymes Uricase POD Ascorbate oxydase 4-Aminophénazone	60 U/l 660 U/l 200 U/l 1 mmol/l
<b>Calibrant</b>	Acide urique (Standard)	6 mg/dl

✓ **Réactif de travail:** dissoudre le contenu d'une bouteille de R2 dans un flacon de R1.

Mélanger légèrement.

## 1.14.2. Mode opératoire

	Blanc	Etalon	Essai
R (ml)	1.0	1.0	1.0
Standard (µl)	/	25	/
Echantillon (µl)	/	/	25

✓ Mélanger et incuber 10 min à 15-25°C. Lire l'absorbance (A) des échantillons et de l'étalon contre le blanc à 520 nm. La couleur est stable 30 min.

### 1.14.3. Calcul de concentrations

$$\text{Acide urique (mg/dl)} = \frac{\text{DO échantillon}}{\text{DO standard}} \times \text{concentration de standard (6 mg/dl)}$$

### 1.15. Dosage de la lipase

➤ **Echantillon:** sérum.

#### 1.15.1. Réactifs

<b>Réactif 1</b>	Enzymes-Substrat	
	1,2-Diglycérides	1.1 mmol/l
	Monoglycéride lipase	880 UI/l
	Glycérol Kinase	1340 UI/l
	Glycerol-3-phosphate oxydase	40 KU/l
	TOOS	0.07%
	ATP	0.66 mmol/l
	Peroxydase	1340 UI/l
	Colipase	40 UI/l
	Tampon	pH 6.8
	Ascorbate oxydase	2.6 UI/l
	Conservateurs	
<b>Réactif 2</b>	Tampon	
	Acide Cholique	5.3 mmol/l
	Tampon	pH 6.8
	Azoture de sodium	< 0.1%
<b>Réactif 3</b>	Réactif déclenchant	
	Désoxycholate	36 mmol/l
	4-Aminoantipyrine	0.12%
	Azide de sodium	< 0.1%
<b>Calibrant</b>	Lipase (Standard)	

✓ **Réactif de travail:** Après ouverture, ajouter sans délai au contenu du flacon R1 la quantité de tampon (flacon R2) indiquée sur l'étiquette. Mélanger doucement et attendre la dissolution complète avant d'utiliser le réactif (environ 10 minutes).

#### 1.15.2. Mode opératoire

	Blanc	Etalon	Essai
<b>R (ml)</b>	1.0	1.0	1.0
<b>Standard (µl)</b>	/	20	/
<b>Echantillon (µl)</b>	/	/	20

✓ Mélanger vigoureusement, laisser 4 minutes à 37°C.

	Blanc	Etalon	Essai
<b>R3 (µl)</b>	350	350	350

✓ Mélanger vigoureusement, incuber 3 minutes à 37°C. Déclencher un

chronomètre et enregistrer les absorbances toutes les minutes pendant 3 minutes à 550 (546-550) nm.

### 1.15.3. Calcul de l'activité enzymatique

$$\text{Activité Lipase (U/l)} = \frac{(\Delta\text{Abs/min}) \text{ échantillon} - (\Delta\text{Abs/min}) \text{ Blanc}}{(\Delta\text{Abs/min}) \text{ Calibrant} - (\Delta\text{Abs/min}) \text{ Blanc}} \times \text{concentration de calibrant}$$

### 1.16. Dosage d' $\alpha$ -Amylase

➤ **Echantillon:** sérum.

#### 1.16.1. Réactifs

<b>Réactif</b>	MES	100 mmol/l, pH 6.0
	CNPG3	2.25 mmol/l
	Chlorure de sodium	350 mmol/l
	Acétate de calcium	6 mmol/l
	Thiocyanate de potassium	900 mmol/l
	Azoture de sodium	0.95 g/l

#### 1.16.2. Mode opératoire

	Sérum
<b>R (ml)</b>	1.0
<b>Echantillon (µl)</b>	20

- ✓ Mélanger, incubé 30 sec.
- ✓ Lire l'absorbance initiale (A1) de l'échantillon.
- ✓ Déclencher un chronomètre et enregistrer les absorbances toutes les minutes pendant 3 minutes à 405 nm.

#### 1.16.3. Calcul de l'activité enzymatique

$$\text{AMS (U/L)} = \Delta\text{DO/min} \times 3954$$

### 1.17. Dosage de calcium

➤ **Echantillon:** sérum.

#### 1.17.1. Réactifs

<b>Réactif 1</b>	Tampon Éthanolamine	500 mmol/l
<b>Réactif 2</b>	Chromogène o-Crésolphtaléine 8-Hydroxyquinoléine	0.62 mmol/l 69 mmol/l
<b>Calibrant</b>	Calcium (Standard)	10 mg/dl

## 1.17.2. Mode opératoire

	Blanc	Etalon	Essai
<b>R1 (ml)</b>	1.0	1.0	1.0
<b>R2 (ml)</b>	1.0	1.0	1.0
<b>Standard (µl)</b>	/	20	/
<b>Echantillon (µl)</b>	/	/	20

- ✓ Mélanger, incubé pendant 5 min à 37 °C /15-25 °C.
- ✓ Lire l'absorbance de l'échantillon et de standard, contre le blanc à 570 nm (550-590).  
La couleur est stable 40 min.

## 1.17.3. Calcul de concentrations

$$\text{Calcium (mg/dl)} = \frac{\text{DO échantillon}}{\text{DO standard}} \times \text{concentration de standard (10 mg/dl)}$$

## 1.18. Dosage de phosphore

- **Echantillon:** sérum.

## 1.18.1. Réactifs

<b>Réactif 1</b>	Molybdique Molybdate/Borate Acide sulfurique	1.21 mmol/l 100 mmol/l
<b>Réactif 2</b>	Catalyseur 1,2 Phenylénediamine	2.59 mmol/l
<b>Calibrant</b>	Phosphore (Standard)	5 mg/dl

- ✓ **Réactif de travail:** mélanger les mêmes volumes de la solution R1 et de la solution R2. Le réactif est stable 10 h à 2-8 °C.

## 1.18.2. Mode opératoire

	Blanc	Etalon	Essai
<b>R (ml)</b>	1.5	1.5	1.5
<b>Standard (µl)</b>	/	50	/
<b>Echantillon (µl)</b>	/	/	50

- ✓ Mélanger, incubé pendant 10 min à 37 °C ou 30 min à 15-30 °C.
- ✓ Lire l'absorbance de l'échantillon et de standard, contre le blanc à 710 nm (620-750).  
La couleur est stable 2 h.

## 1.18.3. Calcul de concentrations

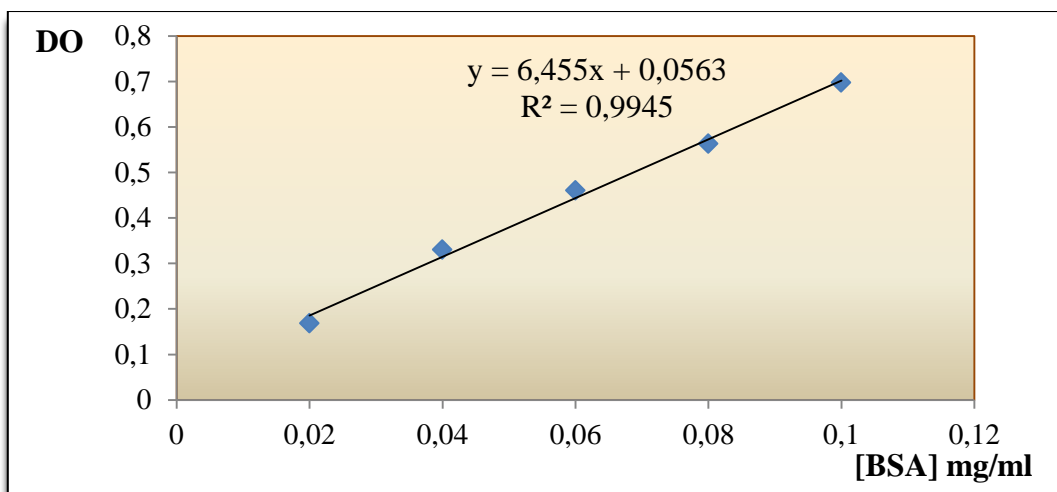
$$\text{Phosphore (mg/dl)} = \frac{\text{DO échantillon}}{\text{DO standard}} \times \text{concentration de standard (5 mg/dl)}$$

## 2. Réactif de Bradford et courbe d'étalonnage

### 2.1. Réactif de Bradford

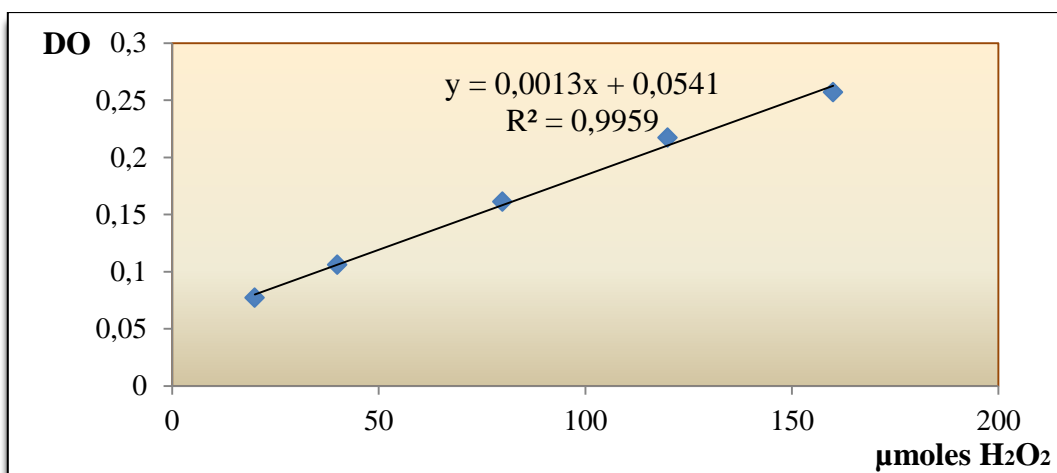
- ✓ Dissoudre 100 mg de bleu de Coomassie dans 50 ml d'éthanol 95%.
- ✓ Agiter la solution pendant 2 heures en obscurité.
- ✓ Ajouter 100 ml d'acide phosphorique 85%.
- ✓ Compléter jusqu'à 1 l le volume total de la solution avec de l'eau distillée.
- ✓ Filtrer la solution finale obtenue.
- ✓ La solution est stable 1 mois à 4 °C.

### 2.2. Courbe d'étalonnage



**Figure 1.** Courbe d'étalonnage utilisée pour le dosage des protéines tissulaire

### 3. Détermination de l'activité CAT



**Figure 2.** Courbe d'étalonnage utilisée pour la détermination de l'activité CAT

## 4. Résultats

## 4.1. Effet sur les paramètres biochimiques

Tableau 1. Variation des paramètres biochimiques chez les rats Wistar

Treatments	Control (n = 6) Mean SEM	Vit E + Se (n = 6) Mean SEM	AgNO <sub>3</sub> (n = 6) Mean SEM	AgNO <sub>3</sub> + vit E (n = 6) Mean SEM	AgNO <sub>3</sub> + Se (n = 6) Mean SEM	AgNO <sub>3</sub> + vit E+ Se (n = 6) Mean SEM
Glucose <sup>1</sup>	0.13 ± 0.02	0.14 ± 0.013	0.13 ± 0.01	0.14 ± 0.03	0.15 ± 0.022	0.14 ± 0.01
ASAT <sup>2</sup>	56.99 ± 12.94	76.05 ± 12.05	72.01 ± 16.86	66.20 ± 21.50	64.17 ± 18.34	72.92 ± 10.24
ALAT <sup>2</sup>	34.22 ± 16.57	27.27 ± 10.39	36.70 ± 16.74	43.07 ± 14.59	36.55 ± 9.12	45.28 ± 11.15
LDH <sup>2</sup>	481.2 ± 114.3	411.23 ± 113.8	654.9 ± 141.9*	436.9 ± 156.1	443.8 ± 160.7	370.2 ± 141.0##
PAL <sup>2</sup>	93.06 ± 28.65	116.78 ± 29.65	58.85 ± 17.73*	77 ± 5.16	101.7 ± 34.85###	83.6 ± 28.14
Bilirubine directe <sup>1</sup>	2.08 ± 0.68	2.07 ± 0.6	2.08 ± 0.87	1.22 ± 0.25**	2.12 ± 0.53	2.32 ± 0.59
Protéines totales <sup>1</sup>	7.28 ± 1.68	6.46 ± 0.87	4.78 ± 1.06**	5.86 ± 0.66#	7.80 ± 1.01###++	5.2 ± 0.41
Albumine <sup>1</sup>	3.27 ± 0.84	2.94 ± 0.97	3.49 ± 0.65	3.14 ± 0.33	3.75 ± 0.52	3.14 ± 0.9
Cholestérol <sup>3</sup>	1.86 ± 0.62	1.66 ± 0.76	3.12 ± 0.62**	1.26 ± 0.46###	1.64 ± 0.65###	1.32 ± 0.31###
Triglycérides <sup>3</sup>	1.11 ± 0.35	1.20 ± 0.48	1.18 ± 0.65	1.23 ± 0.13	1.52 ± 0.4	1.26 ± 0.4
Lipids totaux <sup>4</sup>	262.59 ± 71.2	326.26 ± 131.9	341.67 ± 55.4	323.07 ± 68.5**	323.77 ± 29.4+	219.63 ± 61.9###
Créatinine <sup>4</sup>	0.69 ± 0.29	1.03 ± 0.14	1.015 ± 0.24	1.052 ± 0.52	0.86 ± 0.23	0.95 ± 0.37
Urée <sup>4</sup>	35.2 ± 11.53	32.41 ± 8.69	33.33 ± 5.42	36.61 ± 5.35	37.21 ± 6.42	36.08 ± 5.00
Acide urique <sup>4</sup>	4.05 ± 0.88	4.73 ± 0.89	4.02 ± 1.52	4.45 ± 1.26	4.86 ± 0.82	4.22 ± 1.44
Lipase <sup>2</sup>	179.43 ± 46.4	123.41 ± 35.47	247.7 ± 39.5*	224.1 ± 63.3	221.43 ± 64.8	170.16 ± 73.5
α-Amylase <sup>2</sup>	531.6 ± 93.5	622.62 ± 95.93	548.7 ± 90.5	537.1 ± 49.7+	605.4 ± 152.5	635.8 ± 95.5
Calcium <sup>4</sup>	11.95 ± 1.24	11.48 ± 2.84	9.73 ± 2.46*	10.20 ± 2.91	11.56 ± 2.94	11.69 ± 2.06
Phosphore <sup>4</sup>	7.73 ± 1.81	6.22 ± 0.73	6.25 ± 0.80	6.15 ± 1.11	6.28 ± 1.19	6.48 ± 0.7

\*p < 0.05, \*\*p < 0.01: difference significative entre AgNO<sub>3</sub> et témoins,# p < 0.05, ## p < 0.01, ### p < 0.001: difference significative entre AgNO<sub>3</sub> et autres groupes,+ p < 0.05, ++ p < 0.01: difference significative entre AgNO<sub>3</sub> + vit E, AgNO<sub>3</sub> + Se and AgNO<sub>3</sub> + vit E + SeUnités: <sup>1</sup> g/dl; <sup>2</sup> U/l; <sup>3</sup> mmol/l; <sup>4</sup> mg/dl