

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



جامعة باجي مختار - عنابة
UNIVERSITE BADJI MOKHTAR - ANNABA



FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE
LABORATOIRE : LBSE

THÈSE

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de DOCTORAT
En Biologie
Option : Santé environnementale

THEME

Etude de la cytotoxicité de l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique
via l'exploration de l'état antioxydant et anti-inflammatoire chez
le rat Wistar : effet prophylactique des antioxydants naturels

Présentée par : Mr. TICHATI Lazhari

Directeur de thèse :	Mr. OUALI Kheireddine	Pr	Université Badji Mokhtar Annaba
Membres de Jury:			
Président :	Mr. ACHOU Mohamed	Pr	Université Badji Mokhtar Annaba
Examineurs :	Mme. LAKBAR Chanez	MCA	Université Badji Mokhtar Annaba
	Mme. SOUIKI Lynda	Pr	Université 8 Mai 1945 Guelma
	Mme. BOUSSEKINE Samira	MCA	Université Larbi Tébessi Tébessa

Année universitaire : 2019/2020

REMERCIEMENTS

Avant tout الحمد لله

Cette thèse ponctue le fruit de connaissances, expériences et réflexions échangées entre de nombreuses personnes en divers endroits et moments. J'espère que chacune s'y retrouvera un peu et que ceux qui m'ont aidé à réaliser ce travail prendront autant de plaisir à le lire que j'en ai eu à le faire.

Je tiens alors à remercier les personnes suivantes :

Mon directeur de thèse, **Pr OUALI Kheireddine** de m'avoir donné la possibilité de réaliser ce travail, je vous remercie pour vos conseils pratiques, techniques et scientifiques tout au long de cette formation. Je voudrais également souligner vos qualités scientifiques et humaines, lesquelles m'ont permis après chaque entretien d'être inspiré et motivé afin de mettre ce travail en exécution le plus efficacement possible. Eternelle reconnaissance et merci encore pour TOUT.

Ce travail a été réalisé au Laboratoire de Bio-surveillance Environnementale (LBSE) Université Badji Mokhtar, Annaba ; sous la responsabilité de Monsieur le Professeur **OUALI Kheireddine**.

J'exprime ensuite mes remerciements aux membres du jury :

Monsieur ACHOU Mohamed Professeur à l'université Badji Mokhtar d'Annaba, pour m'avoir fait l'honneur de présider mon jury de soutenance.

Je tiens à adresser mes très sincères remerciements aux membres du jury qui ont accepté d'examiner ce travail : Mme le Docteur **Lakber Chahinez** Maitre de conférences A à l'université d'Annaba, Mme **SOUIKI Lynda** Professeur à l'université de Guelma, Mme le Docteur **BOUSSEKINE Samira** Maitre de conférences A à l'université de Tébessa.

Je remercie également Mme OUALI TREA. F, quelle trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance pour m'avoir guidée dans mon travail, et pour sa confiance, son soutien, et surtout pour ces grandes qualités humaines

Je remercie également Mr le Professeur **A. LADJAMA** Ex-Directeur du laboratoire de Biochimie et microbiologie appliquée pour m'avoir donné l'opportunité de réaliser une partie de ce travail au sein de son laboratoire.

- L'ensemble du personnel administratif et est étudiants du département de biochimie qui ont contribué à ce travail. Merci.

- Tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin.

RÉSUMÉS

Résumé

L'objectif de ce travail est d'évaluer l'effet cytoprotecteur et l'action antioxydante de l'extrait aqueux de *Thymus munbyanus* et du sélénium (à des doses de 10 ml/kg et de 0.2 mg/kg du poids corporel) contre la cytotoxicité et le stress oxydatif induits par le 2,4-dichlorophénoxytique chez le rat Wistar. L'extrait aqueux de la plante a été étudié afin de déterminer la teneur en composés phénoliques et sa capacité antioxydante *in vitro*. Les résultats obtenus montrent que le traitement par le 2,4-D a provoqué des altérations graves au niveau des biomarqueurs hépatiques révélées par une augmentation des marqueurs plasmatiques : les transaminases (ALAT, ASAT), la phosphatase alcaline (PAL), lactate déshydrogénase (LDH) et la bilirubine (BT), associé à une diminution des protéines totales et de l'albumine. Il a accompagné d'une augmentation des marqueurs en puissance de la filtration rénale à savoir ; l'urée, la créatinine avec la diminution de l'acide urique. En outre, des troubles hématologiques (globules rouges, hémoglobine) ont été enregistrés, Un effet globalement pro oxydant, synonyme d'une diminution de la teneur en glutathion réduit (GSH), de l'activité enzymatique de la superoxyde dismutase (SOD), de la catalase (CAT), de la glutathion peroxydase (GPx), de la glutathion S-transférase (GST) et de l'acétyle cholinestérase cérébrale, combiné à une augmentation du taux de MDA et des protéines carbonylées (PCO) dans les organes étudiés (foie, reins et cerveau). Nos résultats montrent également que les suppléments par voie orale, de l'extrait aqueux de *Thymus munbyanus* ou du sélénium, chez les rats traités par le 2,4-D, semblent rétablir certains paramètres sanguins avec une diminution des effets cytotoxiques du 2,4-D, et ce en augmentant certains taux antioxydants et par conséquent atténuer l'intensité du stress oxydant induit par le 2,4-D, confirmé par l'étude histologique du foie et des reins. D'après ces résultats, la supplémentation orientée en extraits des plantes médicinales et d'oligo-éléments à fort potentiel protecteur s'est révélé être une méthode prometteuse pour atténuer les effets néfastes du stress oxydatif induit par le 2,4-D.

Mots-clés : 2,4-D ; Stress oxydatif ; *Thymus munbyanus* ; Sélénium ; Antioxydant ; Effet protecteur ; Rat.

Abstract

This investigation was carried out to evaluate the cytoprotective effect of aqueous extract of *Thymus munbyanus* (10 ml/kg b.wt) and selenium (0.2 mg/kg b.wt) against cytotoxicity induced by 2,4-D in albino Wistar rats. The aqueous extract of the plant was analyzed to determine the phenolic content and the antioxidant capacity. According to the results of this study, the treatment with 2,4-D caused liver and kidney dysfunctions, which were revealed by an increase of transaminases (ALAT, ASAT), alkaline phosphatase (PAL), lactate dehydrogenase (LDH) and bilirubin (BT), urea, creatinine with the decrease in uric acid. Meanwhile, a decrease in total protein and albumin were noticed. In addition, hematological disorders (red blood cells, hemoglobin) have been recorded. Moreover, the 2,4-D led a decrease of reduced glutathione content (GSH), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GSH-Px), glutathione S-transferase (GST) activities with an increase of MDA and carbonyl proteins levels in liver, kidney and brain. Besides, the xenobiotic resulted in a decline of cerebral acetyl cholinesterase activity. However, oral supplementation of aqueous extract of *Thymus munbyanus* or and selenium to 2,4-D-treated rats. It improved and restored the previous renal and hepatic parameters. In other words, it attenuated the intensity of the oxidative stress induced by 2,4-D, which was confirmed by the histological amelioration of both liver and kidney. Based on these results, supplementation focused on medicinal plants extracts and trace elements with high potential protector, has been shown to be a promising method for mitigating the adverse effects of 2,4-D-induced oxidative stress.

Keywords: 2,4-D; Oxidative stress; *Thymus munbyanus*; Selenium; Antioxidant; Rats.

الملخص

الهدف من هذا العمل هو دراسة التأثير المضاد للأكسدة للمستخلص المائي للزعرتر الحر والسيلينيوم بجرعة 10 مل/كغ و0.2 مغ/ كغ وزن حي، على الترتيب في حماية الخلايا من الإجهاد التأكسدي والتسمم الخلوي الناتجين عن المعاملة بالمبيد العشبي بجرعة 5 مغ/ وزن حي، عند الجرذان الذكور من سلالة "Wistar". تمت دراسة المستخلص المائي للنبتة لتقدير المحتوى الفينولي والقدرة المضادة للأكسدة في المختبر (*in vitro*). أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها أن العلاج بـ حمض الكلوروفينوكسيستيك 2,4-D تسبب في اختلال وظائف الكبد وزيادة نشاط الأنزيمات الناقلة للأمين والفسفاتاز القلوي ونقصان تركيز كل من البروتين والألبومين في المصل، الوظيفة الكلوية (زيادة كل من اليوريا، الكرياتينين و انخفاض حمض اليوريا في المصل) وبعض المؤشرات الدموية (كريات الدم الحمراء، الهيموغلوبين) ، بالإضافة إلى ذلك فان حمض الكلوروفينوكسيستيك م عموما مولد للأكسدة، وقد ظهر هذا من خلال زيادة مؤشر الأكسدة الليبيدية من جهة، ونقصان كمية الجلوتاثيون المرجع وانخفاض نشاط أنزيمات (GST,GPx, CAT, SOD) في الأعضاء المدروسة من جهة أخرى. تظهر نتائجنا أيضًا أن المكملات عن طريق الفم من للمستخلص المائي للزعرتر أو السيلينيوم الجرذان التي عولجت بـ 2,4-D يبدو أنها تعيد بعض معايير الدم وتقلل من التأثيرات السامة للخلايا لـ 2,4-D عن طريق زيادة مضادات الأكسدة معينة، وبالتالي تخفيف شدة الإجهاد التأكسدي الناجم عن 2,4-D، أكدته الدراسة النسيجية للكبد والكلى. بناءً على هذه النتائج، فقد ثبت أن المكملات التي تركز على مستخلصات النباتات الطبية والمعادن الضرورية ذات القدرة العالية على الحماية، وسيلة واعدة للتخفيف من الآثار الضارة للإجهاد التأكسدي الناجم عن حمض الكلوروفينوكسيستيك

الكلمات الدالة: حمض الكلوروفينوكسيستيك، الإجهاد التأكسدي، للمستخلص المائي للزعرتر، السيلينيوم، مضاد للأكسدة، التأثير الوقائي، جرذان

TABLE DES MATIERES

RESUMÉ.....	I
ABSTRACT.....	II
الملخص.....	III
LISTE DES FIGURES.....	X
LISTE DES TABLEAUX.....	XII
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	XIII
INTRODUCTION.....	1

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE 1. LES PESTICIDES

1. Généralités sur les pesticides.....	4
1.1. Définition.....	4
1.2. Classification des pesticides.....	4
1.2.1. Selon leurs cibles.....	4
1.2.2. Selon leur nature chimique.....	5
1.1.3. Selon leurs utilisations.....	6
1.3. Effet des pesticides sur la santé et sur l'environnement.....	7
2. Les herbicides chlorophénoxyacides.....	7
2.1. L'acide 2,4-Dichlorophénoxyacétique (2,4-D).....	8
2.1.1. Les formulations commerciales du 2,4-D disponibles en Algérie.....	9
2.1.2. Propriétés physico-chimiques du 2,4-D.....	10
2.1.3. La toxicité du 2,4-D.....	10
2.1.4. Métabolisme du 2,4-D.....	13
2.1.4.1. Absorption.....	13
2.1.4.2. Distribution.....	13
2.1.4.3. Elimination.....	13
2.1.5. Le 2,4-D et le stress oxydant.....	14

CHAPITRE 2. LE STRESS OXYDATIF

1. Définition.....	15
2. Les radicaux libres biologiques.....	15
3. Sources cellulaires des radicaux libres.....	16
4. Effets du stress oxydant sur les macromolécules biologiques.....	17
4.1. Peroxydation lipidique.....	17
4.2. Oxydation des protéines.....	18
4.3. Dommages oxydatifs de l'ADN.....	19
5. Implication du stress oxydant dans les pathologies.....	20
6. Les systèmes de défenses antioxydants	21
6.1. Systèmes antioxydants enzymatiques.....	22
6.1.1. Superoxydes dismutases (SOD : EC 1.15.1.11).....	22
6.1.2. Glutathion peroxydases (GPx : EC 1.11.1.9).....	22
6.1.3. Glutathion-S-Transférases (GST, EC 2.5.1.18).....	23
6.1.4. Catalases (CAT : EC 1.11.1.6).....	23
6.1.5. Les thiorédoxines (TRx) et la thiorédoxine réductase (TRxR).....	24
6. 2. Systèmes antioxydants non- enzymatiques.....	24
6. 2.1. Glutathion.....	24
6. 2.2. Acide alpha-lipoïque.....	24
6. 2. 3. Mélatonine.....	24
6. 2.4. Acide urique.....	26
6. 2.5. Coenzyme Q 10.....	26
6. 2.6. Acide ascorbique.....	26
6. 2.7. Vitamine E (tocophérol).....	26
6. 2.8. Les ligo-éléments.....	26
6. 2.9. Les polyphénols.....	27
6.2.9.1. Les polyphénols et la santé humaine.....	28

CHAPITRES 3. LE SÉLÉNIUM

1. Les propriétés physico-chimiques du sélénium.....	29
2. Les principales formes chimiques du sélénium.....	29
3. Importance biologique du sélénium.....	29
4. Utilisation du sélénium.....	30
4.1. Utilisation industrielle du sélénium.....	30
4.2. Utilisation médicale du sélénium.....	30
5. Métabolisme du sélénium.....	31
5.1. Absorption du sélénium.....	31
5.2. Transport du sélénium.....	31
5.3. Métabolisme du sélénium.....	32
5.4. Elimination du sélénium.....	31
6. Carence et toxicité du sélénium.....	33

CHAPITRE 4. APERÇU BIBLIOGRAPHIQUE SUR LA PLANTE ETUDÉE

1. Généralités.....	35
2. Le genre <i>Thymus</i>	35
2.1. Caractéristiques du genre <i>Thymus</i>	35
2.3. Description botanique de <i>Thymus coloratus</i>	36
2.3.1. <i>Thymus munbyanus</i> subsp. <i>coloratus</i> (Boiss. & Reut.) Greuter & Burdet.....	37
2.3.2. Noms vernaculaires.....	37
2.3.4. Description botanique de <i>T. munbyanus</i> Boiss. & Reut.....	38
2.4. Aires de répartition.....	38
2.5. Métabolites secondaires identifiées dans le genre <i>Thymus</i>	39
2.5.1. Les acides phénoliques.....	39
2.5.2. Les flavonoïdes.....	40
2.5.2.1. Les flavones.....	40
2.5.2.2. Les flavanones.....	40
2.5.2.3. Les flavonols et dihydroflavonols.....	40
2.5.3. Les huiles essentielles.....	40
2.6. Utilisations pharmacologiques de <i>Thymus</i>	41

PARTIE EXPÉRIMENTALE

CHAPITRE 5. MATERIEL ET METHODES

1. But et objectifs.....	42
2. Les produits chimiques.....	43
3. Matériel végétal.....	43
3.1. Présentation du site d'échantillonnage	43
3.1.1. Localisation géographique.....	43
3.1.2. Caractéristiques climatiques.....	44
3.2. Préparation de l'extrait.....	45
3.2.1. Préparation de l'extrait aqueux lyophilisé de <i>Thymus munbyanus</i>	45
3.3. Etude de la composition chimique de <i>Thymus munbyanus</i>	45
3.3.1. Dosage colorimétrique des composés phénoliques totaux.....	45
3.3.2. Dosage des flavonoïdes totaux.....	47
3.3.3. Dosage des tanins condensés.....	48
3.4. Evaluation de l'activité antioxydante <i>in vitro</i>	49
3.4.1. Etude de l'activité antioxydante : Méthode DPPHT.....	49
3.4.2. Etude de l'activité antioxydante : Méthode de blanchiment du β -carotène.....	50
3.4.3. Etude de l'activité antioxydante : Méthode de réduction du Fer : FRAP.....	52
4. Traitement des rats.....	53
4.1. Animaux et conditions d'élevage.....	53
4.2. Répartition et traitement des rats.....	53
5. Sacrifices des animaux.....	56
5.1. Prélèvement sanguin.....	56
5.2. Prélèvement des organes.....	56
6. Dosage des paramètres biochimiques : hépatique et rénale.....	56
7. Dosage des paramètres hématologique : Formule de numérotation sanguine.....	56
8. Dosage des paramètres du stress oxydant.....	57
8.1. Préparation de l'homogénat de tissus.....	57
8.2. Dosage des protéines.....	57
8.3. Dosage du glutathion(GSH).....	58

8.4. Détermination de la peroxydation lipidique par la mesure du taux du malondialdéhyde (MDA) au niveau tissulaire.....	59
8.5. Dosage des protéines carbonylées (PCO).....	60
8.6. Dosage de l'activité enzymatique de la glutathion peroxydase (GPX)	62
8.7. Dosage de l'activité enzymatique de la catalase (CAT).....	63
8.8. Dosage de l'activité de la superoxyde dismutase (SOD).....	64
8.9. Dosage de l'acétylcholinestérase (AChE).....	65
9. Étude histologique.....	66
10. Analyse statistique.....	67

CHAPITRE 6. RESULTATS & DISCUSSION

1. Études phytochimique et activité antioxydante de l'extrait aqueux de <i>Thymus munbyanus</i> ...	68
1.1. Études phytochimique.....	68
1.2. Activité antioxydante.....	68
1.2.1. Méthode DPPH.....	68
1.2.2. Méthode de blanchiment du bêta-carotène.....	69
1.2.3. Pouvoir réducteur du Fer (FRAP).....	70
Discussion	71
2. Impact du 2,4-D sur les paramètres physiologiques, biochimiques et hématologiques : effets protecteurs de la supplémentation en extrait aqueux de <i>Thymus munbyanus</i> et /ou en sélénium.....	74
2.1. Effet du 2,4-D sur la santé générale des rats.....	74
2.2. Evaluation du poids corporel et du poids des organes.....	74
2.2.1. Poids corporel.....	74
2.2.2. Poids absolus et relatif des organes : Foie, rein, cerveau.....	74
Discussion	77
2.3. Etude des paramètres biochimiques	
2.3.1. Effet du traitement sur les réponses des marqueurs biochimiques de la fonction hépatique.....	79
2.3.2. Effet du traitement sur le métabolisme glucidique et lipidique.....	80

2.3.3. Effet du traitement sur les réponses des marqueurs biochimiques de la fonction rénale.....	80
2.3.4. Effet du traitement sur les paramètres hématologiques.....	80
Discussion	84
3. Stress oxydant induit par le 2,4-D : Effets protecteurs de la supplémentation en extrait aqueux de <i>Thymus munbyanus</i> et/ou en sélénium.....	88
3.1. Effet du traitement sur les paramètres non-enzymatiques.....	88
3.1.1. Taux du glutathion réduit.....	88
3.1.2. Peroxydation lipidique.....	88
3.1.3. Taux de protéines carbonylées.....	89
3.2. Effet du traitement sur les paramètres enzymatiques.....	91
3.2.1. Activité enzymatique de la superoxyde dismutase.....	91
3.2.2. Activité enzymatique de la catalase	91
3.2.3. Activité enzymatique de la glutathion peroxydase.....	91
3.2.4. Activité enzymatique de la glutathion - S- transférase.....	92
3.2.5. Activité enzymatique du lactate déshydrogénase cérébrale.....	92
3.2.6. Activité enzymatique de l'acétylcholinestérase cérébrale.....	92
4. Etude histologique.....	96
4.1. Etude histologique du foie.....	96
4.2. Etude histologique des reins.....	98
4.3. Etude histologique du cerveaux.....	101
Discussion	103
CONCLUSION	108
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	110
ANNEXES	137

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Formule chimique des chlorophénoxyacides.....	8
Figure 2. Les principaux sites cellulaires de productions des EROs.....	17
Figure 3. Les différentes cibles des espèces réactives de l'oxygène (EROs).....	20
Figure 4. Les défenses antioxydantes dans l'organisme (Kurutas, 2015).....	21
Figure 5. Mode d'action des principaux systèmes enzymatiques antioxydants et de leurs cofacteurs métalliques	24
Figure 6. Vitamine C.....	26
Figure 7. Vitamine E.....	26
Figure 8. Schéma simplifié du métabolisme cellulaire du sélénium.....	33
Figure 9. <i>Thymus munbyanus subsp. Coloratus</i>	38
Figure 10. La structure chimique du 2,4-D (acide 2,4-dichlorophénoxyacétique)	43
Figure 11. Localisation géographique du site de récolte	44
Figure 12. <i>Thymus munbyanus subsp. coloratus</i>	44
Figure 13. Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.....	46
Figure 14. Courbe d'étalonnage de la quercétine.....	47
Figure 15. Courbe d'étalonnage de la catéchine.....	48
Figure 16. Réaction de piégeage du radical DPPH par le phénol	49
Figure 17. Schéma récapitulatif de l'expérimentation.....	55
Figure 18. Principe de dosage du glutathion.....	58
Figure 19. Réaction du dialdéhyde malonique avec l'acide thiobarbiturique.....	59
Figure 20. Réaction entre les protéines carbonylées et le DNPH.....	61
Figure 21. Pourcentage d'activité antiradicalaire de l'extrait aqueux de <i>Thymus munbyanus</i> , de l'acide ascorbique et du BHT.	69
Figure 22. Cinétique de l'inhibition de blanchissement du β -carotène par extrait de <i>Thymus munbyanus</i> , du contrôle positif BHT et du contrôle négatif.....	70
Figure 23. Pouvoir réducteur de l'extrait aqueux, de l'acide ascorbique et du BHT	71
Figure 24. Variation de l'activité enzymatique de la superoxyde dismutase dans le foie et les reins chez les rats témoins et traités.....	93

Figure 25. Variation de l'activité enzymatique de la catalase dans le foie et les reins chez les rats témoins et traités pendant 4 semaines de traitement.....	93
Figure 26. Variation de l'activité enzymatique de la glutathion peroxydase dans le foie et les reins chez les rats témoins et traités pendant 4 semaines de traitement.....	94
Figure 27. Variation de l'activité enzymatique de la glutathion S transférase dans le foie les et les reins chez les rats témoins et traités.....	94
Figure 28. Variation de l'activité enzymatique de la catalase et de l'activité de la glutathion peroxydase chez les rats témoins et traités pendant 4 semaines de traitement.....	95
Figure 29. Variation de l'activité enzymatique de la lactate déshydrogénase (UI/L) et de l'activité de l'acétylcholinestérase (nmol/min/mg protéine) cérébrale chez les rats témoins et traités.....	95
Figure 30. Coupes hépatiques colorées représentatives du traitement chez les rats témoins et traités.....	96
Figure 31. Photomicrographie de l'histopathologie du tissu rénal chez les rats témoins et traité au 2,4-D.....	98
Figure 32. Photomicrographie de l'histologie du tissu rénal chez les rats traités au 2,4-D et de l'extrait de <i>Thymus munbyanus</i> et chez ceux traités au 2,4-D et du Se.....	100
Figure 33. Coupes histologiques du tissu nerveux des rats traités au 2,4-D.....	101
Figure 34. Coupes du tissu neuronal chez les rats traités par le 2,4-D et à de l'extrait aqueux de <i>Thymus</i> et /ou en sélénium.....	102

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Propriétés physico-chimiques du 2,4-D.....	10
Tableau 2. Principales EROs radicalaires et non-radicalaires	16
Tableau 3. Structure des squelettes des polyphénols	27
Tableau 4. Les principales formes chimiques du sélénium.....	29
Tableau 5. Rendement et teneur en composés phénoliques totaux, flavonoïdes et en tanins condensés dans l'extrait aqueux de <i>Thymus munbyanus</i>	68
Tableau 6. Variation de poids corporel, poids absolu (g) et relatif (g/100g de PC) du foie, des reins et du cerveau chez les rats témoins et traités après 30 jours du traitement.....	75
Tableau 7. Les biomarqueurs plasmatiques de la fonction hépatique chez les rats témoins et traités après 30 jours du traitement.....	81
Tableau 8. Effet du traitement sur le métabolisme glucidique et lipidique chez les rats témoins et traités après 30 jours du traitement	82
Tableau 9. Variation des paramètres biochimiques de la fonction rénale chez rats témoins, traités par EQT, Se, 2,4-D, les combinaison 2.4-D / EQT et 2.4-D/ Se après 30 jours de traitement.....	82
Tableau 10. Profil hématologique chez les rats témoins et les traités après 30 jours de traitement.....	83
Tableau 11. Variation du glutathion, de MDA et de PCO dans les organes (Foie, rein et cerveau) chez les rats témoins et traités ; par EQT, Se, le 2,4-D et au combinaisons (2,4-D/EQT) ; (2,4-D/Se) après 30 jours de traitement.....	90

LISTE DES ABRÉVIATIONS

Enzymes/ions/substances :

2,4-D	Acide 2,4-dichlorophénoxyacétique
4-HNA	4-hydroxyl nonéal
AcCoA	Acétyle coenzyme A
ACh	Acétylcholine
AChE	Acétylcholinestérase
AGPI	Acide gras polyinsaturé
ALAT	Alanine aminotransférase
ASA	Acide acétylsalicylique
ASAT	Aspartame aminotransférase
ATP	Adénosine triphosphate
BHT	Hydroxytoluène butylé
BSA	Albumine de sérum bovin
BT	Bilirubine totale
CAT	Catalase
CCMH	Concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine
CDNB	1-chloro, 2,4-dinitrobenzène
CL50	Concentration létale 50
DL50	Dose létale 50
DPPH	1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle
DTNB	Acide 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoïque)
EDTA	Ethylène diamine tétra-acétique
EQT	Extrait aqueux de <i>Thymus munbyanus</i>
Fe²⁺	Ion ferreux
Fe³⁺	Ion ferrique
FNS	Formule numération sanguine
GB	Globule blanc
GR	Globules rouges

GSH	Glutathion réduit
GSH-Px	Glutathion peroxydase
GSH-R	Glutathion réductase
GSH-ST	Glutathion S-Transférases
GSSG	Glutathion oxydé
H & E	Hématoxyline-Eosine
H₂O₂	Peroxyde d'hydrogène
HCl	Acide hydrochlorique
HCT	Hématocrite
HGB	Hémoglobine
HO₂•	Radical hydroperoxyle
LDH	Lactate déshydrogénase
LOO•	Radical peroxyde
LOOH	Hydroperoxyde
MDA	Malondialdéhyde
MO	Monocytes
Na₂HPO₄	Hydrogénophosphate de sodium
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit
NaH₂PO₄	Dihydrogénophosphate de sodium
PAL	Phosphatase alcaline
PCO	Protéines carbonylées
PLT	Plaquettes
R•	Radical d'acide gras
RH	Acide gras
RNS	Espèces réactives de l'azote
RO•	Radical alkoxy
ROO•	Radical peroxyde
ROOH	Hydroperoxyde organique
ROS	Espèces réactives oxygénées
Se	Sélénium
Se-Cys	Sélocystéine

SEM	Erreur standard de la moyenne
-SH	Groupement sulfhydryle (thiol)
SOD	Superoxyde dismutase
SSA	Acide sulfosalicylique
TBA	Acide thiobarbiturique
TBArs	Substances réactives à l'acide thiobarbiturique
TBS	Tris buffer salin
TCA	Acide trichloracétique
TCMH	Hémoglobine corpusculaire moyenne
TrxR	Thiorédoxine réductases
VGM	Volume globulaire moyen
Vit C	Vitamine C

Unités :

dl	Décilitre
G	Gramme
g/l	Gramme / litre
L	Litre
mg	Milligramme
mg/dl	Milligramme / décilitre
min	Minute
mol	Mole
UI/l	Unité internationale / litre
µl	Microlitre

INTRODUCTION

Introduction

Plus que jamais l'homme a conscience aujourd'hui que sa santé passe par celle de l'environnement et par son alimentation.

L'utilisation excessive et non-contrôlée de molécules chimiques, dans l'agriculture en tant qu'engrais, les herbicides, les insecticides a abouti à une augmentation effrayante de la fréquence des maladies (cancers, maladies cardiovasculaires, respiratoires, troubles hormonaux, ...etc.) (Hernández *et al.*, 2013). Ces molécules aux mille vertus publicitaires se trouvent maintenant pointées du doigt en raison de leur toxicité avérée.

Les herbicides chlorophénoxy constituent une famille de substances agrochimiques utilisés depuis les années 50 dans diverses cultures ainsi qu'en sylviculture (Jayakody *et al.*, 2015). Une centaine de ces dérivées sont aujourd'hui encore présents sur le marché mondial pour une exploitation au profit de l'agriculture (Fenner *et al.*, 2013). C'est le cas de l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique, produit chimique, analogue de l'acide auxine indole-acétique naturel (IAA) systémique sélectif, commercialisé sous forme d'acides libres, d'esters et/ou de sels (Peterson *et al.*, 2016). Ces différentes formes présentent une toxicologie similaire selon les résultats de plus de 60 études qui ont été entreprises par le groupe IndustryTask Force II (Bus *et Hammond*, 2007).

Le 2,4-D est l'adjuvant actif du « Désormone lourd D », une spécialité contenant le 2,4-D sous forme d'ester, largement utilisé pour contrôler le développement des adventices des cultures céréalières (blé dur, blé tendre, orge et avoine) ainsi qu'en hygiène publique pour l'entretien des pelouses (Peterson *et al.*, 2016). Il reste le plus utilisé par les agriculteurs en raison de son faible coût et de son efficacité à faibles doses.

Cependant, il n'est pas sans innocuité pour la santé humaine et l'environnement (Islam *et al.*, 2017). Il a été rapporté que le 2,4-D est susceptible d'affecter le foie (Tayeb *et al.*, 2013 ; Al-Baroudi *et al.*, 2014), les reins (Troudi *et al.*, 2011), les profils du métabolisme lipidique (Nakbi *et al.*, 2010), et le système nerveux (Amel *et al.*, 2016).

Des études récentes indiquent que l'un des mécanismes de la toxicité du 2,4-D est la génération des espèces réactives de l'oxygène (EROs), se traduisant par une peroxydation lipidique et des dommages oxydatifs qui jouent un rôle majeur dans les lésions hépatiques et rénales (Nakbi *et al.*, 2012 ; Dakhakhni *et al.*, 2016), ce qui se traduit par la diminution de la capacité antioxydante totale de l'organisme.

Récemment, l'attention s'est portée sur les plantes comme une source de molécules naturelles bioactives aux propriétés antioxydantes puissantes et qui peuvent être employées pour se protéger contre les effets du stress oxydant induit par divers toxiques (Puttanna et al., 2016 ; Al-Attar et al., 2017 ; Hegazy et al., 2018).

Thymus munbyanus subsp. coloratus est une plante médicinale endémique du Nord algérien qui appartient à la famille des Lamiaceae, connue sous son nom vernaculaire de « Zaaitra » (Benchabane et al., 2012). L'utilisation du thym est passée d'une herbe traditionnelle à un remède important pour traiter : les gastrites, l'hypertension, le diabète, les maladies du système endocrinien et en usage externe comme cicatrisants et antiseptiques (Miara et al., 2019). Elle est douée des propriétés antioxydantes, antiprolifératives et antimicrobiennes remarquables (Sadou et al., 2016, Bendif et al., 2016). Les extraits de *Thymus munbyanus* sont riches en composés phénoliques, y compris ; les polyphénols, les flavonoïdes et les tanins (Kholkhal et al., 2013 ; Sofiane et al., 2015).

Dans un contexte parallèle, le sélénium est un micronutriment d'une grande importance en nutrition humaine (Papp et al., 2007). Connu pour ses propriétés antioxydants (Wrobel et al., 2016 ; Liu et al., 2017), il exerce sa fonction via l'expression des sélénoprotéines (Ruseva et al., 2015). Ses effets biologiques sont directement liés à son intégration dans la structure de différentes protéines sous la forme d'un cofacteur ou d'un acide aminé (Roman et al., 2014). Des études récentes ont démontré que cet élément en état de traces à un effet antioxydant capital contre un large éventail de xénobiotiques (Ben-Saad et al., 2017. Ansar et al., 2017 ; Mansour et al., 2017).

L'objectif de ce travail de recherche expérimental est d'essayer de contrecarrer l'effet d'une cytotoxicité induite par le 2,4-D via une supplémentation en infusion de *Thymus munbyanus* et / ou en sélénium chez les rats de la souche Wistar.

Cette étude se divisée en deux parties :

Une première partie sera consacrée à l'étude *in vitro*, de la quantification des phénols totaux, des flavonoïdes et des tannins, puis l'étude de l'activité antioxydante de l'extrait de *Thymus munbyanus*.

Une seconde partie, *in vivo*, concerne l'évaluation de l'effet protecteur de l'extrait aqueux de *Thymus munbyanus* d'une part et de la supplémentation en sélénium d'autre part chez des rats traités par le 2,4-D. Cette partie repose sur :

- La détermination de quelques paramètres relatifs à la croissance de l'animal ;

- L'évaluation de certains paramètres biochimiques et hématologiques ;
- L'évaluation du système pro/antioxydant par la détermination des activités enzymatiques ; des superoxydes dismutases (SOD), de la glutathion peroxydases (GPx), la catalase (CAT), de la glutathion S transférase (GST) et de l'acétyle cholinestérase cérébrale et quelques éléments non- enzymatiques comme le glutathion réduit, MDA et les protéines carbonylées ;
- Étude histologique des organes cibles tels que le Foie, les reins et le cerveau ;
- Une discussion des résultats obtenus ;

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE 1. LES PESTICIDES

1. Généralités sur les pesticides

1.1. Définition

Les pesticides sont des substances synthétisées ou des agents biologiques utilisés pour prévenir, contrôler, attirer, détruire ou atténuer tous les organismes jugés nuisibles. Ils sont principalement utilisés en agriculture pour protéger les cultures contre les insectes, les mauvaises herbes et les maladies bactériennes ou fongiques pendant la croissance et pour protéger les aliments pendant le stockage des rats, des souris, des insectes ou de divers contaminants biologiques. Leur action peut se faire par : contact, ingestion ou autres sortes d'expositions durant les périodes de croissance ([Bolognesi et Merlo, 2011](#)).

1.2. Classification des pesticides

La classification des pesticides est principalement basée sur :

-La nature de leurs cibles (nature de l'espèce à combattre) : ainsi on distingue les insecticides, les herbicides et les fongicides...etc.

-Leur nature chimique : organochlorés, organophosphorés...etc.

-Leurs utilisations : agriculture, santé publique ou domestique ([Jayaraj et al., 2016](#)).

1.2.1. Selon leurs cibles

- **Les insecticides**

Un insecticide est une substance active ou une préparation toxique utilisée pour lutter contre les parasites qui infectent les plantes cultivées ou pour éliminer les insectes vecteurs de maladies ([Lushchak et al., 2018](#)).

- **Les fongicides**

Ils permettent de combattre la prolifération des maladies de plantes provoquées par des champignons parasites (mildiou, oïdium ...) et ils servent à protéger les tubercules, les fruits et les légumes pendant le stockage et la croissance des plantes ([Lushchak et al., 2018](#)).

- **Les herbicides**

Ils représentent les pesticides les plus utilisés dans le monde toutes cultures confondues. Ils sont destinés à éliminer les végétaux rentrant en concurrence avec les plantes à protéger en ralentissant leur croissance. Les herbicides sont connus comme régulateurs de croissance,

inhibiteurs de la photosynthèse, inhibiteurs de la biosynthèse des acides aminés et des lipides, perturbateurs de la membrane cellulaire et inhibiteurs de la biosynthèse des pigments (Lushchak et al., 2018).

Les herbicides les plus connus sont l'acide sulfurique, utilisé pour désherber les céréales dès 1911, et les phytohormones (2,4-D) ainsi que des dérivés de l'acide 2-phénoxy-éthanoïque (comme le MCPP) et les sulfonilurées.

Le classement par cible distingue également les molluscicides contre les escargots et les limaces ; les rodenticides contre les rongeurs ; les acaricides contre les acariens... etc.

1.2.2. Selon leur nature chimique

Il s'agit d'un classement technique qui tient compte la nature chimique de la substance active. Ainsi, en fonction de leur structure chimique, les pesticides les plus répandus, peuvent être répartis dans les groupes suivants :

- **Les organochlorés**

Les pesticides organochlorés sont des pesticides synthétiques appartiennent au groupe des dérivés des hydrocarbures chlorés. Les caractéristiques de base des pesticides organochlorés sont une persistance élevée, une faible polarité, une faible solubilité dans l'eau et une liposolubilité. Très résistants à la dégradation biologique, ces composés sont connus par leur toxicité, leur persistance dans l'environnement et leur bioaccumulation élevée (Jayaraj et al., 2016).

- **Les organophosphorés**

Il s'agit des composés organiques qui contiennent un ou plusieurs atomes de phosphore dans leur molécule. Les organophosphorés (OP) sont des esters de l'acide phosphorique. Leur dégradation est plus rapide dans les systèmes biologiques (Tadeo et al., 2008). Ils agissent par inhibition de l'acétylcholinestérase de façon irréversible au niveau des terminaisons nerveuses (Lushchak et al., 2018). Parmi les herbicides organophosphorés ; le glyphosate et le glufosinate sont les plus commercialisés.

- **Les carbamates**

Ce sont des produits constitués d'esters de l'acide carbamique ($R_1 - O - CO - NR_2R_3$). Leur mécanisme d'action est l'inactivation réversible de l'enzyme acétylcholinestérase. Les carbamates se décomposent dans l'environnement en quelques semaines ou quelques mois, exemples : Chlorpropham, Desmedipham, Molinate, Phenmedipham, Propham (Bouseba, 2011).

- **Les phénoxyacides**

C'est un groupe de composés portant un radical phénoxy lié à un acide alcanoïque à faible nombre de carbone, tel que l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique ou le mécoprop (acide propionique). Certains herbicides de ce groupe sont formés par des stéréo-isomères, qui sont commercialisés sous forme d'énantiomères simples ou de mélanges racémiques (Tadeo et al., 2008) :

- Acide 2,4-Dichloro-phénoxy-acétique. (2,4-D)
- Diclofop: (RS)-2-[4-(2,4-Dichlorophenoxy) phenoxy] propionic acid.
- Fenoxaprop-P: (R)-2-[4-(6-Chloro-1,3-benzoxazol-2-yloxy) phenoxy] propionic acid.
- Fluazifop-P: (R)-2-[4-(5-Trifluoromethyl-2-pyridyloxy) phenoxy] propionic acid.
- MCPA: 4-Chloro-(2-methylphenoxy) acetic acid.
- Mecoprop-P: (R)-2-(4-Chloro-o-tolyloxy) propionic acid.
- Triclopyr : 3,5,6-Trichloro-2-pyridyloxyacetic acid

❖ **Autres**

Il y a d'autres pesticides qui sont utilisés dans les pratiques agricoles comme le Fer, le Plomb, le Soufre, l'Arsenic, le Mercure, le Zinc. Ils ont été utilisés sous leur forme de métal inorganique ou organique. Le Chlorure de méthyle mercurique, l'arséniate de sodium, l'arséniate de calcium, le phosphore de zinc sont des composés qui entrent dans cette catégorie (Jayaraj et al., 2016).

1.2.3. Selon leurs utilisations

Selon le domaine de leur utilisation on distingue deux grandes catégories de pesticides :

- Les pesticides à usage agricole (produits phytopharmaceutiques) destinés à la protection des végétaux contre les maladies et contre les organismes nuisibles aux cultures.
- Les biocides destinés à la protection des éléments de construction, hygiène publique, ou des animaux domestiques (Bencheikh, 2010).

1.3. Effet des pesticides sur la santé et sur l'environnement

Les pesticides constituent un groupe hétérogène de produits chimiques. Ces produits sont principalement utilisés dans le domaine agricole pour améliorer l'agriculture. En effet, ce domaine doit faire face à une demande croissante pour l'alimentation (Bourguet et Guillemaud, 2016).

Cependant les pesticides sont soupçonnés de présenter un risque pour la santé humaine et l'environnement (Kim *et al.*, 2017 ; Islam *et al.*, 2017). Ils sont des causes de morbidité et de mortalité élevées. Leur application affecte souvent les espèces non- ciblées. Ces produits chimiques affectent non seulement la culture et les animaux dans une zone spécifique, mais nuisent également l'équilibre de l'écosystème par la modification de la chaîne alimentaire et de l'écosystème.

En raison des propriétés cumulatives de nombreux pesticides, ils circulent dans les écosystèmes et peuvent être accumulés par de nombreux organismes vivants et migrer à travers les chaînes alimentaires (Jayaraj *et al.*, 2016). En outre le ruissellement et l'érosion peuvent être des voies d'entrée chimiques importantes dans les eaux de surface affectant ainsi les organismes aquatiques. Les produits chimiques persistants peuvent également s'accumuler par d'autres mécanismes, notamment l'absorption directe d'eau par les branchies ou la peau via l'absorption de particules en suspension et via la consommation d'aliments contaminés (Lushchak *et al.*, 2018).

La faune terrestre peut être exposée aux pesticides via la consommation d'aliments ou d'eau contaminée. En effet, plusieurs études ont rapporté que l'exposition directe ou indirecte aux pesticides entraîne des troubles neuromusculaires et une stimulation du métabolisme des médicaments et des stéroïdes (Subramaniam et Solomon, 2006 ; USEPA, 2010). Ces derniers exercent leur toxicité suite à la production exagérée de radicaux libres, ce qui favorise l'apparition et le développement de certaines pathologies y compris les maladies neuro-dégénératives, gastro-intestinales, dermatologiques, cancer et asthme (Raanan *et al.*, 2014 ; Koutros *et al.*, 2015).

2. Les herbicides chlorophénoxyacides

Les herbicides chlorophénoxy constituent une famille de substances agrochimiques qui sont des analogues structuraux des auxines ou hormones de croissance végétales, agissant de façon systémique par pénétration foliaire en stimulant de façon anarchique la croissance de la plante.

Les herbicides auxiniques sont des antidicotylédones de post-levée, Ils sont utilisés depuis les années 50 dans diverses cultures et en sylviculture. Une centaine de ces dérivées sont aujourd'hui encore présents sur le marché mondial du fait d'une exploitation agricole et commerciale (Grube *et al.*, 2011 ; Fenner *et al.*, 2013, Jayakody *et al.*, 2015). L'acide 2,4-Dichlorophénoxyacétique (2,4-D) est un herbicide apparenté à la famille des herbicides chlorophénoxyacides largement utilisées dans l'agriculture en Algérie sous forme de spécialité contenant le 2,4-D sous forme d'ester, sels alcalins et sels d'amine. En effet, il existe actuellement plus de 600 produits contenant 2,4-D sur

le marché. Les formulations commerciales incluent des liquides, des poudres hydrosolubles, des granules, ou des granules de 2,4-D (Song, 2014).

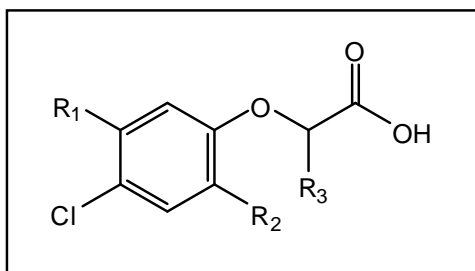


Figure 1. Formule chimique des chlorophénoxyacides

2.1. L'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4-D)

Le 2,4-D est une substance, analogue de l'acide auxine indole-acétique naturel (IAA) systémique, sélectif, employé pour le contrôle des dicotylédones, car il agit sur la prolifération des cellules du cambium et occasionne des perturbations de la croissance, les plantes monocotylédones ne possèdent pas de cambium, d'où l'absence d'effet sur ces dernières. Il a été commercialisé pour la première fois en 1944 et produit par American Chemical Paint Company (Song, 2014), commercialisé sous forme d'acides libres, d'esters et/ou de sels. Ces différentes formes présentent une toxicologie similaire selon les résultats de plus de 60 études qui ont été entreprises par le groupe IndustryTask Force II (Bus and Hammond, 2007 ; Peterson et al., 2016). Le 2,4-D est commercialisé dans diverses formulations sous une grande variété de marques, seul ou dans les mélanges commerciaux d'herbicides comme par exemple Dicamba(Acide 3,6-dichloro-2-méthoxybenzoïque), mécoprop (acide méthyl-1chlorophénoxy-propionique, MCP), mécoprop-P (l'énantiomère (R) - (+) - du mécoprop), MCPA (Acide 2-méthyl-4-chlorophénoxy-acétique), piclorame (Acide 4-amino-3,5,6-trichloro-picolinique) et clopyralide (3,6-dichloro pyridine-2-carboxylique acide) (PubChem, 2015).

Le plus utilisé à l'échelle mondiale en raison de son faible coût et de son efficacité à faibles doses (Liu et al., 2013 ; Peterson et al., 2016), le 2,4-D est un herbicide largement utilisé dans l'agriculture en Algérie, notamment pour contrôler le développement des adventices des cultures céréalières (blé tendre, blé dure, orge, avoine ...etc.) et aussi pour des usages non agricoles pour éliminer les mauvaises herbes à feuilles larges dans les jardins, les terrains industriels et les zones de prairie.

2.1.1. Les formulations commerciales du 2,4-D disponibles en Algérie

Les formes du 2,4-D les plus utilisées et qui sont disponibles en Algérie selon l'[Index des Produits Phytosanitaires \(2015\)](#) :

- DESORMONE LOURD D : 2,4 -D-ESTER S/F DE BUTYLGLYCOL (872 G/L soit 600G/L acide).EC
- DAMINE 60 : 2,4 D ESTER (600 G/L). Liquide
- INVECTRA : 2,4 D :2,4 D AMINE (720 G/L). SL
- LATON : 2,4 D (72%).EC
- SANHORMONE ® 720 SL: 2,4 D (720 G/L). SL
- ZELLAMIN 60 SL: 2,4 D (60%). SL

Ces formulations sont utilisées pour lutter contre les adventices dicotylédones qui peuvent se développer dans les cultures de céréales : blé tendre, blé dur, seigle, orge, avoine et triticale.

- **Désormone Lourd**

C'est un herbicide antidicotylédones des céréales, sélectif systémique, utilisé au début de la croissance des cultures. Il agit en tant que régulateur de croissance, utilisable en post-levée de la culture. Contenant le 2,4-D sous forme d'ester, il est dosé à 600g de 2,4 D ACID (sous forme d'ESTER-BUTYLGLYCOL) par litre de solution commerciale, sous forme de concentré émulsionnable (EC). Numéro d'homologation : R 09 47 009.

2.1.2. Propriétés physico-chimiques du 2,4-D

Les différentes propriétés physico-chimiques du 2,4-D sont regroupés dans le tableau 1 :

Tableau 1. Propriétés physico-chimiques du 2,4-D

Nom commun	2,4-D	Références
IUPAC	Acide 2,4-Dichlorophénoxyacétique	OMS., 1970 Tomlin., 1994
Formule brute	C ₈ H ₆ Cl ₂ O ₃	
Masse molaire	221,04 g/mol	
Etat physique	Poudre cristalline blanche	
Point de fusion	140,5°C	
Point d'ébullition (53 Pa)	160,5°C	
Densité à 20°C	1,563	
Hydrosolubilité (mg/L)	677 à 25°C La solubilité de l'acide dépend de son degré d'ionisation. Dans une solution tamponnée à pH 7 et à 25°C, la solubilité a été déterminée à 22.8 - 23.9 g/L (DEFRA, 1993) et à 23.18 g/L. (DG SANCO, 2001)	HSDB, 2005 DEFRA, 1993 DG SANCO, 2001
Solubilité dans les solvants	Ethanol (1250 g/kg) Toluène (6,7 g/kg) Xylène (5,8 g/kg) Heptane (1,1 g/kg) Ether diéthylique (243 g/kg)	Tomlin, 1994
Pression de vapeur(pa)	0.000011 à 25°C	HSDB, 2005
Constante de dissociation (pKa)	2.92 à 25°C	DG SANCO, 2001
Log du coefficient de partage Octanol-eau (log Kow)	2.50 - 2.81 à 25°C et pH 1	Verschueren, 2001 DEFRA, 1993 DG SANCO, 2001
Demi-vie DT50(jours)	4-7 jours (dans la plupart des sols)	OMS, 2003

2.1.3. La toxicité du 2,4-D

Les principales voies d'exposition pour les humains sont l'eau potable, le sol et les aliments, la manipulation de produits contenant du 2,4-D et l'exposition environnementale dans les zones traitées avec du 2,4-D comme les terrains agricoles, les jardins et les pelouses, les parcs et les routes (Santé Canada, 2008). En outre l'air contaminé par le 2,4-D peut provoquer des irritations, une sensation de brûlure de la peau, un essoufflement et une sensation de brûlure au niveau des poumons (Ganguli et al., 2014). Son ingestion se traduit par des vomissements, nausées, diarrhée,

maux de tête et des ulcérations diffuses voire des nécroses des muqueuses buccales (Islam et al.,2017).

Dans une étude épidémiologique récente sur les producteurs de maïs exposés au 2,4-D, Lerro et al (2017) ont montré que la quantité de 2,4-D dans leurs urines est considérable par rapport aux groupes témoins (contrôle : population non-exposée). Une augmentation de cinq fois de la concentration du 2,4-D urinaire était associée à une augmentation de 11% de 8-OHdG (une lésion promutagène de l'ADN générée en réponse aux EROs est un marqueur de lésion oxydative) et une augmentation de 14% du 8-isoPGF (Composé de type prostaglandine produit par peroxydation des lipoprotéines non enzymatiques).

Cependant des études récentes sur les professions (métadonnées) ont évalué la possibilité d'un lien épidémiologique entre l'utilisation du 2,4-D et la survenue de certaines formes de cancers. Ces études ont suggéré l'existence d'un lien entre l'exposition au 2,4-D et le développement de la maladie de Parkinson (Tanner et al., 2009) et d'autres types de cancer y compris : sarcome des tissus mous, de lymphome non- hodgkinien et le cancer de la vessie chez les agriculteurs et les ouvriers des usines exposés au 2,4-D au cours des processus de fabrication et d'application (Boers et al., 2010 ; Coggon et al., 2015 ; Koutros et al., 2016).

- **Effets à court terme (toxicité aiguë)**

Chez l'Homme, les études de toxicité aiguë pour le 2,4-D démontrent un niveau de toxicité allant de faible à léger pour les voies d'exposition par inhalation, cutanée ou orale (Bradberry et al., 2004 ; Samuel et al., 2006 ; Bonnard et al., 2011).

- Les préparations à base de 2,4-D sous forme de sels ou d'esters sont en général irritantes pour la peau et les muqueuses.
- L'inhalation peut causer une sensation de brûlure dans la gorge et la poitrine, une faiblesse, une perte d'appétit et de poids, la sudation, des mictions réduites, des étourdissements, une perte de coordination, l'hémorragie gastro-intestinale et des effets sur le système nerveux.
- Les signes cliniques observés après ingestion du 2,4-D sont : une sensation de brûlure, une irritation des muqueuses, des vertiges et une perte temporaire de la coordination musculaire, des vomissements, des douleurs abdominales, des diarrhées, parfois des hémorragies gastro-intestinales, des dommages au cerveau et de l'œdème pulmonaire (Bonnard et al., 2011).

Sur le plan biologique, on peut observer une acidose métabolique, hypocalcémie, hyperkaliémie, hypophosphatémie, hypoglycémie, thrombopénie, leucopénie, élévation des enzymes hépatiques (augmentation des activités de l'aminotransférase) et des CPK chez l'animal : (US EPA, 2005a ; Bonnard *et al.*, 2011 ; Ganguli *et al.*, 2014).

Les différentes formes acides, sels et d'esters du 2,4-D sont du même ordre de toxicité, modérée par voie orale avec des signes cliniques incluant ataxie, réduction de l'activité, atonie musculaire, prostration, hyporéflexie, démarche hésitante et dyspnée, comportant une courte période de récupération.

La DL₅₀ par voie orale pour le 2,4-D, pour l'équivalent en acide d'ester isooctylique, isobutyrique, butylique et butoxyéthanolique, ainsi que pour les sels de sodium et de diméthylamine, se situe entre 420 et 840 mg/kg de poids corporel chez le rat (Gorzinski *et al.*, 1987).

- **Effets à long terme (toxicité chronique)**

Elle se manifeste chez le rat pendant une durée de 91 jours traduite par des effets sur le sang (diminution hématocrite, Hb et globules rouges), sur le foie et les reins ; NOAEL/1mg/kg corporel/jour (Dow Chemical Company, 1983).

Des études récentes sur diverses espèces ont rapporté que le rein est le principal organe cible des effets structuraux, physiologiques et chimiques du 2,4-D, qui s'accumule dans le tissu rénal. Cette susceptibilité du rein à la toxicité produit une variété d'effets toxiques rénaux impliquant les cellules tubulaires et glomérulaires (Uyanikgil *et al.*, 2009 ; Troudi *et al.*, 2011 ; Nakbi *et al.*, 2012).

Des modifications microscopiques dans le foie ont été observées suite à l'exposition au 2,4-D. Ces modifications sont associées aux changements destructifs des cellules hépatiques entraînant par la suite des modifications de la perméabilité et la fuite des enzymes ce qui manifeste par l'augmentation des enzymes sériques et du poids du foie (Tayeb *et al.*, 2013).

Des modifications de certains paramètres hématologiques et de l'hormone thyroïdienne sont également signalées. Toutefois, les perturbations de l'hormone T4 (thyroxine) ne sont pas accompagnées d'effets morphologiques sur la glande thyroïde. Par ailleurs, on signale des perturbations du système nerveux chez des animaux exposés au 2,4-D (Bongiovanni *et al.*, 2007-2011 ; Amel *et al.*, 2016).

Une NOAEL de 5 mg/kg/j et une LOAEL de 75 mg/kg/j a été déterminées chez le rat en situation d'exposition chronique. Les effets critiques retenus étaient une diminution du gain de poids corporel et des troubles hématologiques (US EPA, 2005a).

2.1.4. Métabolisme du 2,4-D

- **Chez l'animal**

2.1.4.1. Absorption

Lors de l'administration orale de 2,4-D chez le rat l'absorption est complète et rapide à partir du tractus gastro-intestinal (> 90 % en 48 heures) la concentration plasmatique maximale étant atteinte après quatre heures. Pour 2,4-D n-butyl ester chez le rat, c'est le 2,4-D acide qui est détecté dans le sang, indiquant une hydrolyse rapide de l'ester. L'absorption est rapide et presque complète (entre 84 et 95 % en 72 heures). Les esters butyles sont absorbés plus lentement et moins complètement que les formes amines (Van Ravenzwaay et al., 2003 ; Bonnard et al., 2011 ; Neumeister, 2014).

2.1.4.2. Distribution

Le 2,4-D sous sa forme acide présente un faible volume de distribution chez le rat. Une fois absorbé, le 2,4-D est largement distribué dans tout le corps, mais ne s'accumule pas en raison de sa clairance plasmatique rapide et de son excrétion urinaire rapide.

L'administration par voie orale, de 0,42 à 0,69 % ou de 1,17 à 2,57 %, respectivement d'une dose faible (1 mg/kg) ou d'une dose forte, le 2,4-D est distribué principalement dans le sang et les organes, au niveau du foie et des reins et à des taux encore plus faibles, dans le cerveau (Van Ravenzwaay et al., 2003 ; Neumeister, 2014).

2.1.4.3. Elimination

Le 2,4-D est principalement excrété sous forme inchangée dans les urines. Plus de 90 % sont éliminés en 48 heures dans les urines et près de 10 % par les fèces. Des métabolites mineurs, dont le 2,4 dichlorophénol, sont également retrouvés dans les urines.

Après administration orale à des rats le 2,4-D a été rapidement absorbé, distribué et excrété, au moins 86-94% de la dose orale a été absorbés par le tractus gastro-intestinal, 2,4-D a été excrété rapidement (85-94%) dans l'urine 48 heures après le traitement sous forme inchangée (Van Ravenzwaay et al., 2003 ; Bonnard et al., 2011 ; Neumeister, 2014).

Les mécanismes de clairance rénale chez les différentes espèces investiguées (rat, souris, chien) ont démontré que le 2,4-D était excrété activement par les tubules proximaux. Il semblerait que la pharmacocinétique du 2,4-D soit non linéaire et dépendante de la dose en raison de la saturation du système de transport et de l'excrétion rénale. À cet effet, la clairance rénale chez le chien serait 30 fois plus faible que chez les rongeurs, expliquant ainsi la plus grande sensibilité du chien aux effets toxiques du 2,4-D (Samuel *et al.*, 2006).

2.1.5. Le 2,4-D et le stress oxydatif

Des études récentes indiquent que l'exposition aux 2,4-D produit le stress oxydatif par la génération des radicaux libres qui est suggéré comme l'un des mécanismes moléculaires de la toxicité de ce pesticide (Tayeb *et al.*, 2013 ; Nakbi *et al.*, 2016). En effet, les EROs sont capables de réagir avec les protéines, les acides nucléiques, les lipides et d'autres molécules. Ceci entraîne des modifications de leur structure, se manifeste par des effets tels que l'inactivation des enzymes, la peroxydation des lipides et les lésions de l'ADN, pouvant finalement conduire à la mort cellulaire par nécrose ou apoptose (Bukowska, 2006 ; Maire *et al.*, 2007 ; Lushchak *et al.*, 2018).

La production accrue des EROs et l'augmentation de la peroxydation lipidique, peuvent affecter les activités protectrices des antioxydants enzymatiques et épuiser le réservoir des molécules antioxydantes non-enzymatiques (Bongiovanni *et al.*, 2011 ; Tayeb *et al.*, 2013). Les produits de peroxydation lipidique peuvent modifier les propriétés physiologiques de la membrane cellulaire. Les changements oxydatifs dans les membranes sont le résultat de la polymérisation de protéines, ce qui aboutit à une augmentation de la rigidité de la membrane érythrocytaire. En raison de ce fait, les pesticides provoquent un déclin de la capacité de la membrane à se déformer. Le 2,4-D peut se lier à certains phospholipides, conduit ainsi à une perturbation des interactions physiques dans la membrane, ce qui augmente la disponibilité des lipides à la peroxydation (Bukowska, 2006).

Le 2,4-D est connu par sa capacité à se lier aux protéines, d'autre part, il peut provoquer des perturbations dans la fonction cellulaire suite à la modification de l'activité des enzymes ce qui aboutit à la mort cellulaire. Di Paolo *et al* (2001) et Dakhkhni *et al* (2016) ont rapporté dans une étude sur des hépatocytes de rat que le 2,4-D a provoqué une modification la structure secondaire des protéines ce qui a conduit à une diminution de structures en feuille β et de la teneur en protéines associé à une perte de structure de la chaîne lipidique de la membrane et la polarité des lipides avec la formation de composés carbonylés et une hypertrophie du foie.

CHAPITRE 2. LE STRESS OXYDATIF

1. Définition

Le stress oxydatif se définit classiquement comme un déséquilibre de la balance entre les systèmes de défenses antioxydants et la production des EROs, en faveur de ces dernières. Ce déséquilibre provient soit d'une surproduction d'agents oxydants, soit d'une altération des mécanismes de défense dans les cellules, un compartiment ou un organisme. Il peut avoir, une origine endogène, telle que la surproduction d'agents pro-oxydants d'origine inflammatoire, un déficit nutritionnel en antioxydants, ou une origine exogène : une exposition environnementale à des facteurs pro-oxydants comme le tabac, les médicaments, les rayons gamma, les rayons UV, les métaux lourds, les pesticides et les solvants industriels... etc (Pham-Huy, 2008 ; Phaniendra *et al.*, 2015).

2. Les radicaux libres biologiques

Un radical libre se définit comme tout atome, groupes d'atomes, ou molécules possédant un ou plusieurs électrons non appariés (célibataires) sur l'orbital externe. Cette caractéristique lui confère une réactivité importante vis-à-vis d'autres molécules plus stables, pour capter ou céder leurs électrons, créant ainsi de nouveaux radicaux en initiant des réactions en cascade (Carange, 2010).

Dans certaines conditions métaboliques, la réduction de l'oxygène est incomplète et aboutit à la formation de radicaux libres. Actuellement, on utilise le terme d'espèces actives de l'oxygène (EROs) ou *Reactive Oxygen Species* (ROS) pour désigner un ensemble plus large de molécules.

D'autres espèces dérivées de l'oxygène, dites espèces actives de l'oxygène comme l'oxygène singlet $^1\text{O}_2$, le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou le nitroperoxyde (ONOOH), ne sont pas des radicaux libres mais sont aussi réactives et peuvent être des précurseurs de radicaux.

L'ensemble des radicaux libres et de leurs précurseurs est souvent appelé espèces réactives de l'oxygène (EROs) (tableau 1).

Tableau 2. Principales EROs radicalaires et non-radicalaires (Dwassy, 2014).

Espèces réactives de l'oxygène (ERO)	
Radicalaire	Non- radicalaire
Radical superoxyde: $O_2^{\cdot-}$	Peroxyde d'hydrogène : H_2O_2
Radical hydroxyle: OH^{\cdot}	Ion hypochlorite : ClO^-
Peroxyde: RO_2^{\cdot}	Ozone : O_3
Alkoxyde: RO^{\cdot}	Oxygène singulet : 1O_2
Hydropéroxyde: HO_2^{\cdot}	Péroxinitrite : $ONOO^-$

3. Les sources cellulaires des radicaux libres

Les EROs peuvent être produites à partir de sources endogènes ou exogènes. Les sources de EROs endogènes incluent différents organes cellulaires tels que les mitochondries, les peroxysomes et le réticulum endoplasmique, où la consommation d'oxygène est élevée. Les autres sources endogènes de EROs comprennent la synthèse de prostaglandine, l'auto-oxydation de l'adrénaline, les cellules phagocytaires, la riboflavine réduite, le cytochrome P 450, l'activation des cellules immunitaires, les inflammations, les infections, le cancer, le vieillissement, l'ischémie... etc (Phaniendra *et al.*, 2015 ; Engwa, 2018).

D'autre part, les EROs sont également produites dans les systèmes biologiques par diverses sources exogènes par exemple : la pollution de l'air et de l'eau, les pesticides, les solvants industriels, les métaux de transition - Cd, Hg, Pb, As- les métaux lourds - Fe, Cu, Co, Cr- les médicaments... etc (Pham-Huy, 2008).

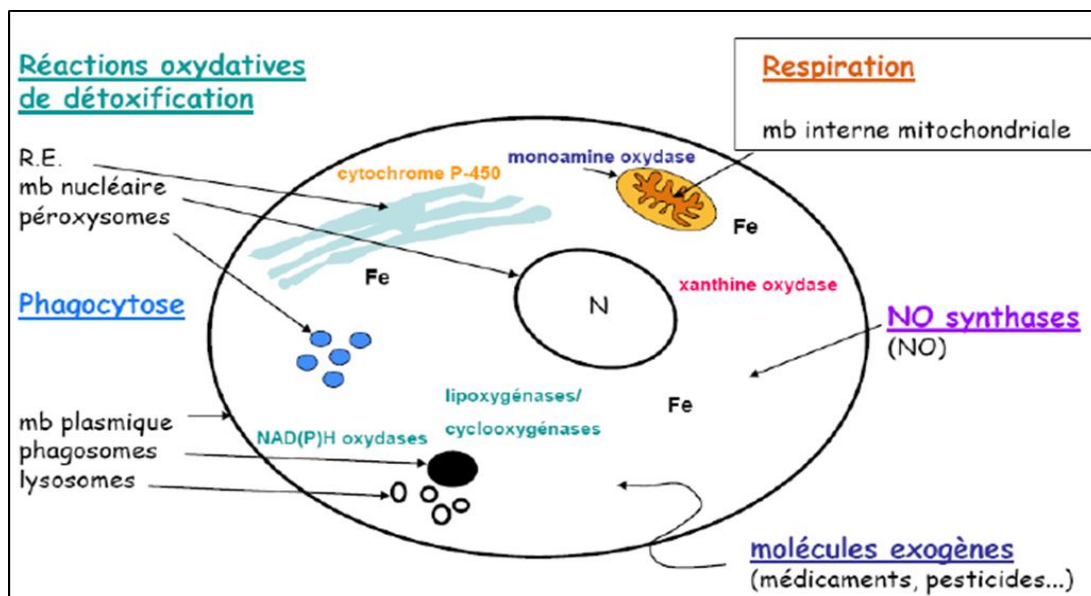


Figure 2. Les principaux sites cellulaires de productions des EROs.

4. Les effets du stress oxydatif sur les macromolécules biologiques

La surproduction de radicaux libres peut entraîner un stress oxydatif et un stress nitrosatif. Comme ces radicaux libres sont très réactifs, ils peuvent endommager les trois classes importantes de molécules biologiques, notamment les lipides, les protéines et les acides nucléiques.

4.1. Peroxydation lipidique

La peroxydation lipidique (ou lipoperoxydation) est l'oxydation des lipides contenant une ou plusieurs doubles liaisons, carbone-carbone, en particulier des acides gras polyinsaturés (AGPI) tels que les acides linoléiques, linoléiques et arachidoniques. Elle est caractérisée par trois phases comprenant l'initiation, la propagation et la terminaison.

- Dans l'étape d'initiation, les pro-oxydants tels que les radicaux : hydroxyles, alcoxyles, peroxydes, l'oxygène singulet ou le peroxydinitrite. Ces espèces sont capables d'arracher un atome d'hydrogène au niveau du groupement méthylène bis-allylique pour former un radical pentadienyl qui se combine ensuite avec l'oxygène pour former un radical peroxyde.
- La phase de propagation débute lorsqu'une molécule d'O₂ attaque le radical acide gras (L[•]) pour former un radical peroxyde (LOO[•]) qui peut arracher un H[•] d'une autre molécule lipidique générant un nouveau L[•] (qui poursuit la réaction en chaîne) et créer un nouveau radical, qui s'oxydera et ainsi de suite (Therond, 2006).

La phase de terminaison correspond à la phase de formation de molécules plus stables non-radicalaires obtenues le plus souvent par réaction entre deux radicaux libres ou grâce à l'action d'un antioxydant.

Ces hydroperoxydes appartiennent à la famille des peroxydes lipidiques qui peuvent soit être réduits et neutralisés par la glutathion peroxydase et la vitamine E intercalée dans la bicouche lipidique des membranes soit se décomposer et libèrent de nombreux produits, tels que le malondialdéhyde (MDA), les isoprostanes et le 4-hydroxynonéal, qui sont considérés comme l'un des plus importants biomarqueurs du stress oxydatif dans les tissus (Haleng *et al.*, 2007; Yin *et al.*, 2011; Singh *et al.*, 2015).

4.2. L'oxydation des protéines

Les EROs sont en effet capables de réagir avec différents acides aminés des chaînes de protéines, altérant également leurs fonctions. Leur oxydation aboutit à la formation de produits carbonylés et hydroxylés. En effet les EROs les plus réactifs avec les protéines sont le radical hydroxyle HO° et le peroxydinitrite ONOO^\cdot . L'ion superoxyde $\text{O}_2^{\circ-}$ est le moins réactif des EROs mais est suffisamment fort pour oxyder les groupements thiols (-SH) de la cystéine. En outre les acides aminés soufrés dont la cystéine et la méthionine, les acides aminés basiques (arginine, leucine) et les acides aminés aromatiques tels que le tryptophane, la phénylalanine et la tyrosine semblent être les plus vulnérables (Halliwell et Guttridge, 2008).

Les EROs peuvent modifier les protéines soit par :

- **Voie directe** : c'est la fragmentation des protéines et la formation de produits carbonylés. En effet, les protéines peuvent être modifiées directement par les espèces réactives de l'oxygène conduisant ainsi à l'oxydation des acides aminés. Cette modification oxydative est réversible, traduite par la formation de disulfures, d'acide sulfénique et de méthionine sulfoxyde résultant de l'oxydation des chaînes latérales des résidus cystéine et méthionine, les plus sensibles à l'oxydation.
- **Voie indirecte** : par la glyco-oxydation (qui résulte de la formation d'une liaison covalente entre la fonction aldéhyde du glucose et les groupement amines des protéines) et de la peroxydation lipidique. Ces composés peuvent réagir avec les résidus lysine et arginine des protéines pour former deux classes de produits ; les AGE (produits de glycation avancée) et les ALE (produits de lipoxydation avancée) (Weiss *et al.*, 2000 ; Stadtman *et al.*, 2003).

Les résultats les plus fréquents de modifications oxydatives des protéines sont les changements dans la structure des protéines et un dépliement partiel de la protéine se traduisant par une diminution de l'activité enzymatique, une susceptibilité plus forte à la dégradation protéolytique, de la stabilité à la chaleur ce qui aboutit à la mort cellulaire par apoptose (Reeg et Grune, 2015).

4.3. Les dommages oxydatifs de l'ADN

Les EROs de sources endogènes ou environnementales ont le potentiel d'oxyder différentes macromolécules de la cellule notamment la molécule d'ADN nucléaire et mitochondrial qui est la plus exposé aux attaques oxydantes à cause de sa proximité des sites de production des EROs et le manque de ressources de réparation (Wallace, 2008). En effet, les ROS peuvent réagir avec les acides nucléiques attaquant les bases azotées et la squelette sucre-phosphate, provoquant ainsi différents types de dommage de l'ADN comme : les cassures simple et double-brin, les lésions, l'instabilité de l'ADN qui comprend le blocage de la réplication et la transcription ainsi que des réarrangements chromosomiques (Evans *et al.*, 2004 ; Gredilla, 2011). En outre, la présence de 8-OHdG (8-hydroxy-2-désoxyguanosine (8-OHdG ; un marqueur des dommages oxydatifs causés à l'ADN) dans les cellules peut entraîner une mutagenèse et jouer ainsi un rôle important dans la carcinogenèse (Cooke *et al.*, 2003).

Les dommages oxydatifs de l'ADN jouent un rôle majeur dans la pathogenèse de nombreuses maladies, y compris ; le cancer, les maladies neurodégénératives, les maladies cardiovasculaires et les maladies inflammatoires chroniques (Thanan *et al.*, 2015 ; Lima *et al.*, 2019).

5. Implication du stress oxydant dans les pathologies

Les phénomènes radicalaires de base sont utiles au bon fonctionnement de l'organisme. L'altération des composants cellulaires et des structures tissulaires intervient lorsque l'intensité de ces phénomènes augmente anormalement et dépasse la quantité d'antioxydants disponibles (Rahman, 2007). La surproduction de radicaux libres peut causer des dommages oxydatifs aux biomolécules telles que, les lipides et les protéines, les lipoprotéines et l'acide désoxyribonucléique (ADN), altérant ainsi le statut redox normal et conduisant à un stress oxydatif accru. En effet le stress oxydatif induit par les radicaux libres serait impliqué dans plusieurs pathologies qui possèdent un caractère radicalaire comme facteur déclenchant ou associé à des complications de l'évolution de plusieurs maladies, tant chroniques que dégénératives, ainsi l'accélération du processus de vieillissement du corps et l'apparition de pathologies, telles que ; le diabète sucré (Bashan *et al.*, 2009; Vanessa *et al.*, 2013), aussi les troubles neurodégénératifs (maladie de

Parkinson-PD, maladie d'Alzheimer-AD et sclérose en plaques-MS) (Uttara *et al.*, 2009), les maladies cardiovasculaires (athérosclérose et hypertension) (Ceriello, 2008 ; Cervantes *et al.*, 2017), les maladies respiratoires (asthme, la maladie pulmonaire obstructive chronique (MPOC)) (Caramori et Papi, 2004), le développement de la cataracte, la polyarthrite rhumatoïde et dans divers cancers (cancers colorectaux, de la prostate, du sein, du poumon et de la vessie) (Phaniendra *et al.*, 2015 ; Pizzino *et al.*, 2017). En outre, Le stress oxydatif est impliqué dans les maladies qui affectent l'appareil rénal, telles que la néphrite interstitielle glomérulaire et tubulaire, l'insuffisance rénale, la protéinurie et l'urémie (Droge, 2002 ; Karam *et al.*, 2013).

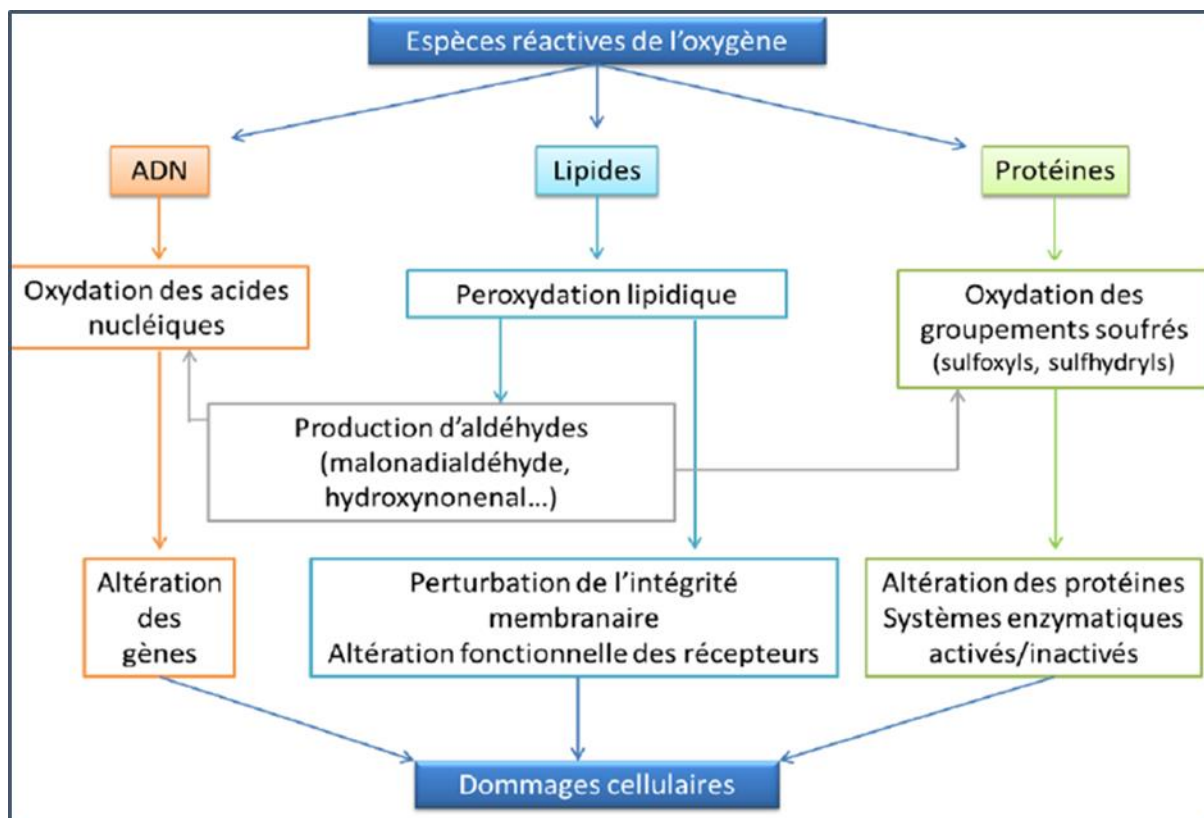


Figure 3. Les différentes cibles des espèces réactives de l'oxygène (EROs)

(Monteil, 2004).

6. Les systèmes de défenses antioxydants

Les antioxydants au sens large représentent l'ensemble des molécules susceptibles d'inhiber directement la production, de limiter la propagation ou de neutraliser les EROs. Ces antioxydants peuvent agir en réduisant, dismutant et en piégeant les EROs afin de former un composé stable (Valko *et al.*, 2007).

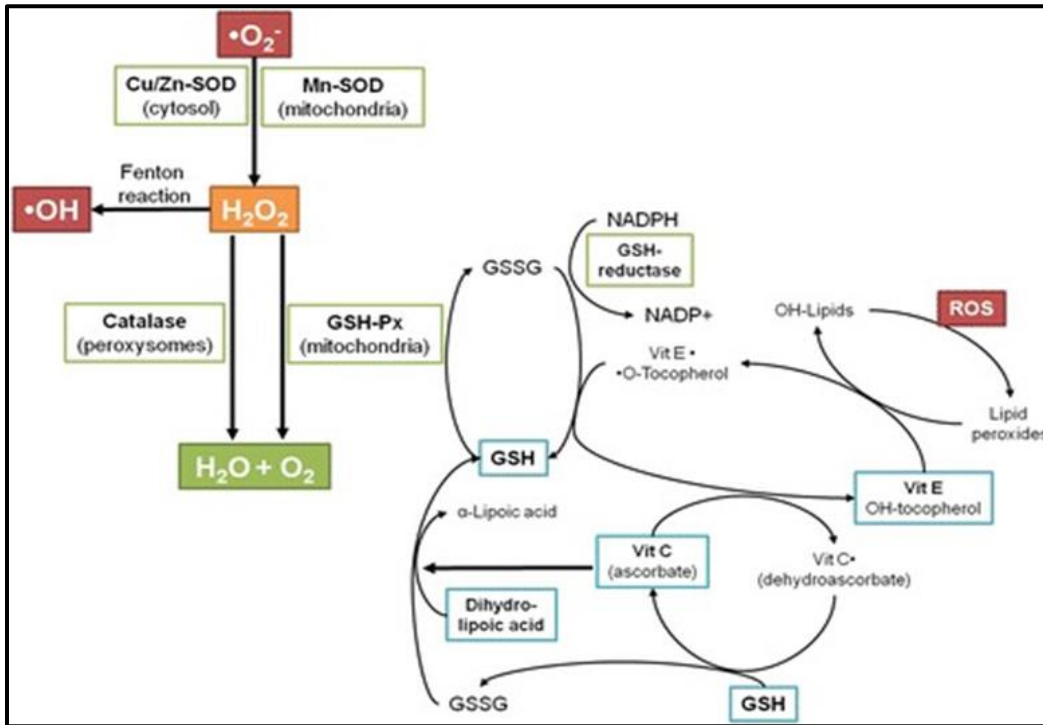


Figure 4. Les défenses antioxydantes dans l'organisme (Kurutas, 2015).

Le système de défense des cellules fait intervenir différents acteurs ; les enzymes antioxydantes, les antioxydants non-enzymatiques et les facteurs de transcription. Leurs mécanismes sont divers, incluant le captage de l'oxygène singulet, la désactivation des radicaux par réaction d'addition covalente, la réduction de radicaux ou de peroxydes, la chélation des métaux de transition. En outre, certains facteurs de transcription permettent l'expression de gènes de défense antioxydante par exemple, l'augmentation modérée des EROs intracellulaires active de la voie de signalisation de Keap1 (*Kelch-like ECH-associated protein 1*)-Nrf2 (*Nuclear factor erythroid 2-related factor 2*), lors de laquelle Nrf2 transloque au noyau et lie les éléments de la réponse antioxydante (*Antioxidant Response Elements*) sur l'ADN, ce qui permet la transcription de gènes comme la SOD et la CAT (Luczaj et al., 2017).

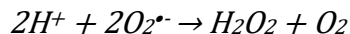
6.1. Les systèmes antioxydants enzymatiques

6.1. Les superoxydes dismutases (SOD EC 1.15.1.11)

Les SODs ce sont des métalloenzymes qui existent sous trois formes dans les tissus des mammifères et qui diffèrent par leurs cofacteurs, leurs emplacements sous-cellulaire et leurs distributions tissulaires.

- La superoxyde dismutase de cuivre-zinc (CuZnSOD) est présente dans le cytoplasme et les organites de presque toutes les cellules de mammifère. (Laukkanen et al., 2016)
- La superoxyde dismutase de manganèse (Mn-SOD) ou de Fer se trouve dans les mitochondries de presque toutes les cellules (Weisiger et Fridovich, 1973 ; Laukkanen et al., 2016).
- La superoxyde dismutase extracellulaire (ECSOD) est une SOD contenant du cuivre et du zinc. Elle a une grande affinité pour l'héparine et les sulfates d'héparine (Marklund ,1982 ; Laukkanen et al., 2016).

Ces enzymes sont la première ligne de défense contre le stress oxydatif en raison de sa capacité de convertir les radicaux superoxydes hautement réactifs en peroxyde d'hydrogène et en oxygène moléculaire (Weisiger,1973 ; Valko et al., 2006 ; Laukkanen, 2016), elles catalysent la dismutation de l'O₂^{•-} en H₂O₂ selon la réaction suivante :

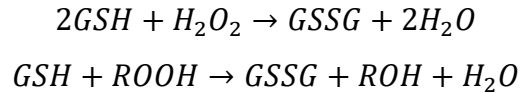


6.1.2. La glutathion peroxydases (GPx :EC 1.11.1.9)

La glutathion peroxydase (GPx) est une sélénoprotéine, formée de quatre sous-unités identiques contenant chacune un atome de sélénium incorporé dans une molécule de sélénocystéine. Elle est présente dans les liquides extracellulaires et dans les cellules au niveau du cytosol et des mitochondries (Rahman., 2007).

Des glutathion peroxydases à sélénium sont retrouvées dans le plasma (pGPx), dans le cytosol (cGPx), au niveau de la membrane cellulaire (HPGPx), et on retrouve une isoenzyme qui est spécifique aux cellules digestives (GIGPx) (Ganther, 2014 ; Boubali, 2017).

La GPx catalyse la réduction du peroxyde d'hydrogène ou du peroxyde organique (ROOH) en eau ou en alcool, ce processus se produit en présence de GSH qui est converti en GSSG (glutathion oxydé). Elle assure plus largement la transformation des hydroperoxydes organiques, lipidiques notamment de type ROOH, en alcools (ROH) (Valko et al., 2006).

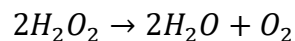


6.1.3. Les Glutathion-S-Transférases (GST, EC 2.5.1.18)

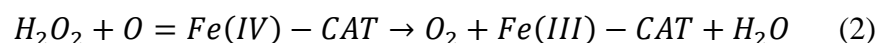
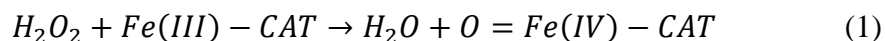
Les GST sont des enzymes de détoxification de la phase II, qui catalysent la conjugaison du glutathion (GSH) à une grande variété de composés électrophiles endogènes et exogènes telles que les espèces réactives de l'oxygène (EROs) ou les xénobiotiques et les cancérigènes environnementaux (Nissar *et al.*, 2017). Ils sont divisés en deux groupes : microsomal liés à la membrane et cytosolique, les GST humaines sont répartis en 8 classes selon leurs propriétés structurales (similarité des séquences nucléotidiques). On distinguera ainsi les classes : Alpha (α), Kappa (κ), Mu (μ), Omega (Ω), Pi (π), Sigma (σ), Thêta (θ) et Zeta (ζ) (Board *et al.*, 2000 ; Umasuthan *et al.*, 2012 ; Revathy *et al.*, 2012).

6.1.4. La catalase (CAT : EC 1.11.1.6)

Les Catalases sont des enzymes qui catalysent la conversion du peroxyde d'hydrogène en eau et oxygène. Ils se composent de quatre sous-unités protéiques, chacune contenant un groupe hème et une molécule de NADPH. La catalase est particulièrement concentrée dans le foie et les érythrocytes, mais se trouve aussi dans d'autres tissus. Dans la cellule, elle est majoritairement concentrée dans les peroxysomes où elle régule la production de H_2O_2 issue des enzymes oxydases et empêche ainsi sa diffusion hors de l'organite (Valko *et al.*, 2006). Elle possède une activité peroxydase et capable d'utiliser une molécule d' H_2O_2 comme substance donneur d'électrons et une autre molécule d' H_2O_2 comme oxydant ou accepteur d'électrons (Murray *et al.*, 2013). Leur fonction principale est de catalyser la décomposition par dismutation du peroxyde d'hydrogène en eau et en dioxygène (Powers et Jackson, 2008). Elle catalyse ainsi la réaction suivante:



Le mécanisme réactionnel met en jeu le Fer (III) de chaque groupement hémique. Celui-ci permet la rupture hétérolytique de la liaison entre les deux atomes d'oxygène de l' H_2O_2 . Au cours de cette réaction le Fer III est oxydé en Fer (IV)=O (1), puissant oxydant qui va dans une seconde étape oxyder une deuxième molécule d' H_2O_2 pour donner une molécule d'eau et une molécule de dioxygène (2) :



5.1.5. Les thiorédoxines (TRx) et la thiorédoxine réductase (TRxR)

Le système thiorédoxine comprend la thiorédoxine (Trx), la thiorédoxine réductase (TrxR) et le NADPH. Les thiorédoxines sont des enzymes à activité antioxydante intrinsèque comme toutes les protéines à groupement thiol (-SH), une fois oxydée, la thiorédoxine sera régénérée par le NADPH sous l'action de la thiorédoxine réductase (TrxR), cette dernière possède un groupement sélénocystéine dans son site actif et elle intervient dans la dégradation des peroxydes lipidiques et du peroxyde d'hydrogène (Bouguerne, 2012).

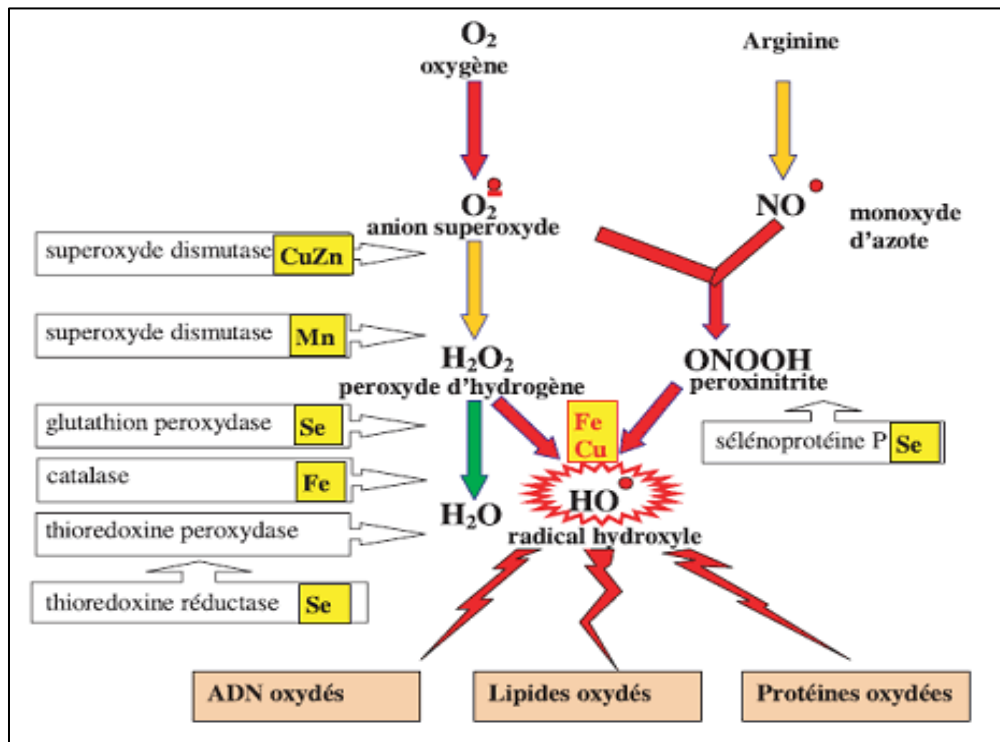


Figure 5. Mode d'action des principaux systèmes enzymatiques antioxydants et de leurs cofacteurs métalliques (Favier, 2003).

6. 2. Les systèmes antioxydants non- enzymatiques

6.2.1. Le glutathion

Il s'agit d'un tripeptide qui joue un rôle à de divers niveaux dans la lutte contre le stress oxydant. Le glutathion (GSH) peut interagir directement avec les espèces oxygénées activées mais il est principalement utilisé comme substrat de la glutathion peroxydase qui assure l'élimination des lipides peroxydés. Il participe au transport des acides aminés à travers la membrane plasmique, piègeur direct du radical hydroxyle, de l'oxygène singulet et participe dans la régénération des vitamines C et E (Birk et al., 2013 ; Kurutas, 2016).

6.2.2. L'acide alpha-lipoïque

L'acide alpha-lipoïque est un acide soufré présent dans toutes les cellules du corps. C'est un puissant antioxydant capable de neutraliser plusieurs types de radicaux libres car l'acide alpha lipoïque est soluble dans l'eau (hydrosoluble) et dans les graisses (liposoluble). En tant qu'antioxydant, c'est un piègeur direct des radicaux libres, il chélate les ions de métaux de transition (par exemple, le Fer et le Cuivre), il augmente les niveaux de glutathion cytosolique et de vitamine C et prévient des toxicités associées à leur perte (Senoglu et al., 2009).

6.2.3. La mélatonine

La mélatonine (N-acétyl-5-méthoxytryptamine) est un des principaux produits de sécrétion de la glande pinéale dans le cerveau, il reconnue pour sa fonction polyvalence. Dans des centaines d'études, la mélatonine a été documentée en tant que piègeur direct des radicaux libres et antioxydant indirect, ainsi qu'en tant qu'agent immun-modulateur important (Kurutas, 2016).

6.2.4. L'acide urique

L'acide urique est formé suite à l'oxydation de l'hypo-xanthine et de la xanthine par la xanthine oxydase. Dans les conditions physiologiques, l'acide urique est majoritairement ionisé sous sa forme d'urate (UrH_2^-). Dans le plasma il possède une forte activité de piégeage des radicaux. C'est un puissant piègeur de radicaux $\bullet\text{OH}$, $\text{ROO}\bullet$ et $\text{NOO}\bullet$ (Haleng et al., 2007).

6.2.5. Le Coenzyme Q 10

Le coenzyme Q, également connu sous le nom Ubiquinone (UQ), synthétisé dans les cellules du corps ou peut également être obtenu à partir de l'alimentation est un puissant antioxydant qui neutralise les EROs et protège la muqueuse interne de la lymphe, des vaisseaux sanguins et de l'endothélium (Quinzii et al., 2007 ; Motohashi et al., 2017).

6.2.6. L'acide ascorbique

L'acide ascorbique, également appelé vitamine C, est l'un des principaux antioxydants hydrosolubles, présent dans les fluides intra et extracellulaires. Ces activités biologiques viennent de son puissant potentiel réducteur, agit principalement en piégeant directement et très efficacement les radicaux superoxydes et hydroxyles, il peut aussi recycler la vitamine E pour prévenir l'oxydation des lipides. Dans les conditions de pH physiologiques la vitamine C existe principalement sous forme d'anion ascorbate (Camarena et Wang, 2016).

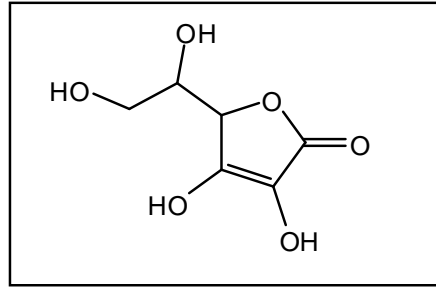


Figure 6. Vitamine C

6.2.7. La vitamine E (tocophérol)

La vitamine E regroupe la famille des tocophérols (alpha, bêta, gamma, delta) avec une activité antioxydante variable. L'alpha tocophérol est la forme la plus active de la classe des tocophérols. Le caractère hydrophobe de la vitamine E lui permet de s'insérer au sein des acides gras de la membrane cellulaire et des lipoprotéines, où elle joue un rôle protecteur en empêchant la propagation de la peroxydation lipidique induite par le stress oxydatif (Joshi et Pratic, 2012 ; Gulcin, 2012).

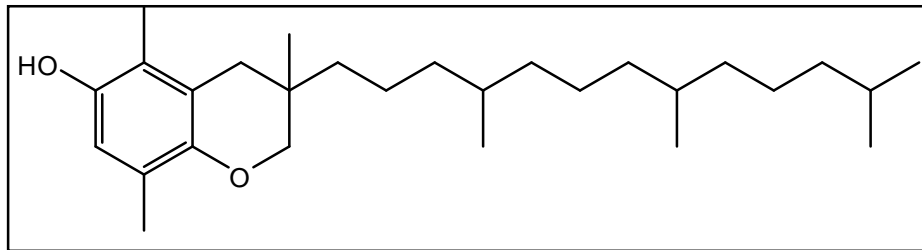


Figure 7. Vitamine E

6.2.8. Les oligo-éléments

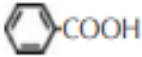
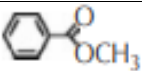
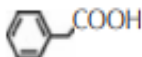
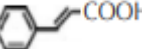
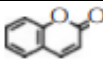
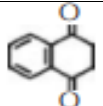
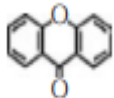
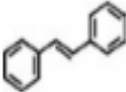
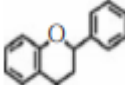
Le sélénium (Se), le zinc (Zn), Le cuivre (Cu), le manganèse (Mn), sont des éléments essentiels possédant des propriétés antioxydantes, ils interviennent comme cofacteurs d'enzymes.

Le sélénium est un cofacteur de l'enzyme glutathion peroxydase et autres sélénoprotéine. Il est doué d'activités antioxydantes et anti- carcinogènes. Le zinc et un cofacteur de l'enzyme superoxyde dismutase. Il fonctionne comme un antioxydant dans le corps via la régulation du métabolisme du glutathion et la modulation de l'expression de la métallothionéine. Le manganèse appartient à la superoxyde dismutase (SOD) mitochondriale (Marreiro et al., 2017 ; Stelmach et al., 2014 ; Tan et al., 2018).

6.2.9. Les polyphénols

Les polyphénols sont des métabolites secondaires de plantes, se divisent en plusieurs classes (les acides phénoliques, les flavonoïdes, les anthocyanes... etc.). Ils peuvent être classifiés selon le nombre et l'arrangement de leurs atomes de carbones (Tableau 3). Ces molécules sont généralement trouvés conjuguées aux sucres et les acides organiques.

Tableau 3. Structure des squelettes des polyphénols (Crozier *et al.*, 2008).

Nombre de carbones	Squelette	Classification	Exemple	Structure de base
7	C ₆ -C ₁	Acides phénols	Acide gallique	
8	C ₆ -C ₂	Acétophénones	Gallacétophénone	
8	C ₆ -C ₂	Acides hydroxycinamiques	Acide p- hydroxy-phénylacétique	
9	C ₆ -C ₃	Acide phénylacétique	Acide p-coumarique	
9	C ₆ -C ₃	Coumarines	Esculitine	
10	C ₆ -C	Naphthoquinones	Juglone	
13	C ₆ -C ₁ -C ₆	Xanthones	Mangiferine	
14	C ₆ -C ₂ -C ₆	Stilbènes	Resvératrol	
15	C ₆ -C ₃ -C ₆	Flavonoïdes	Naringénine	

6.2.9.1. Les polyphénols et la santé humaine

Les polyphénols sont des micro-constituants végétaux abondants dans nos aliments. Ces composés sont reconnus pour leur forte bioactivité qui se traduit au niveau de l'organisme par une large gamme de propriétés biologiques, y compris la protection contre les dommages oxydatifs moléculaires et cellulaires induisant par diverses pathologies (cancers, diabète de type 2, maladies cardiovasculaires et neurodégénératives) (Ozcan *et al.*, 2014 ; Shahidi et Yeo, 2018). Leurs effets protecteurs ont été mis en évidence tant d'un point de vue épidémiologique qu'expérimental (Gaston, 2016). Ils ont la capacité de réguler une diversité de processus cellulaires et moléculaires par interaction avec des cibles protéiques (enzymes, récepteurs, facteurs de transcription), ce qui leur conférant des propriétés anti-athérogéniques, anti-inflammatoires, anti-thrombotiques, anti-carcinogéniques et neuroprotectrices. Les polyphénols sont aussi capables de diminuer d'autres facteurs de risque des maladies cardiovasculaires impliqués dans le syndrome métabolique (hyperglycémie, taux de lipides élevé, insulino-résistance, obésité abdominale et hypertension artérielle) (Amiot *et al.*, 2009). Ils peuvent agir comme des antioxydants de différentes manières via plusieurs mécanismes à savoir ; le piégeage direct des EROs, l'inhibition des enzymes génératrices d'EROs, la chélation des ions de métaux de transitions, responsables de la production des EROs et l'induction de la biosynthèse d'enzymes antioxydantes (Halliwell, 1994 ; 1997).

CHAPITRE 3. LE SÉLÉNIUM

1. Les Propriétés physico-chimiques du sélénium

Le sélénium est un métalloïde positionné entre le soufre (S) et le tellure (Te) dans le groupe 16 du tableau périodique, appartenant à la famille des chalcogènes (oxygène, soufre, tellure, polonium), fut découverte en 1817 par le chimiste suédois Berzelius (Boyd, 2011). De numéro atomique 34 et de masse molaire $78,96 \pm 0,03 \text{ g.mol}^{-1}$. Ses températures de fusion et d'ébullition sont respectivement de $217 \pm 1^\circ\text{C}$ et $684,9 \pm 1^\circ\text{C}$.

Ses propriétés physicochimiques sont proches de celles du Soufre. Ainsi, quel que soit le compartiment de l'écosystème, sa présence est étroitement liée à celle du soufre (Ducros et Favier, 2004 ; Johansson et al., 2005).

2. Les principales formes chimiques du sélénium

Le sélénium est présent dans la nature et les organismes animaux et végétaux sous des formes organiques et inorganiques. Les formes organiques sont la sélénométhionine (Semet) et la sélélocystéine (Secys) ; les formes inorganiques sont les sélénites (SeO_3^{-2}), séléniure, séléniate et l'élément sélénium.

Tableau 4. Les principales formes chimiques du sélénium
(Simonoff M. et Simonoff G, 1991)

Forme chimique	L'état de valence	Formule
Séléniate	6+	SeO_4^-
Sélénite	4+	SeO_3^-
Sélénotrisulfure	0	R-S-Se-S-Re
Sélénodiglutathion	0	G-S-Se-S-G
Séléniure	2-	Se^-

3. Importance biologique du sélénium

Le sélénium est une molécule ambivalente car sa présence en faible concentration est indispensable à la vie de l'homme, les animaux, les végétaux et les micro-organismes. Il est doué d'une grande importance en nutrition humaine, et connu pour ses propriétés antioxydantes (Wrobel et al., 2016 ; Liu et al., 2017). Il exerce sa fonction via l'expression des sélénotéine. Ses effets biologiques sont directement liés à son intégration dans la structure de différentes protéines sous

la forme d'un cofacteur ou d'un acide aminé (Roman *et al.*, 2014), dont la Glutathion peroxydase (GPx), la sélénoprotéine P (SeP) et thiorédoxine réductase (TrxR) (niveau du site actif de la thiorédoxine réductase sous forme de groupement séléno (-SeH).

Il est important dans plusieurs processus biochimiques et physiologiques, y compris la biosynthèse de la coenzyme Q, la régulation des flux ioniques à travers les membranes, la maintenance de l'intégrité des kératines, la stimulation de la synthèse des anticorps (Eltayeb *et al.*, 2004). Ses propriétés antioxydantes lui confère un rôle majeur dans les troubles métaboliques, y compris l'hyperlipidémie, l'hyperglycémie et L'hyper-phénylalaninémie (Wang *et al.*, 2017). Il participe aussi dans la protection et la réparation de l'ADN (Favrot *et al.*, 2018) et peut prévenir l'athérosclérose et le cancer (Hatfield *et al.*, 2014 ; Rayman, 2017 ; Liu.H *et al.*, 2017).

4. Utilisation du sélénium

4.1. Utilisation industrielle du sélénium

Les composés couramment utilisés dans l'industrie sont le dioxyde de sélénium, le sélénite et le sélénite de sodium. Les applications industrielles de ce métalloïde et de ses composés peuvent être divisées en différentes catégories. Trente pour cent des applications concernent les domaines électrique et électronique. Il a été utilisé pour le redressement du courant alternatif, photocellules, photocopieurs à tambour.

Certains composés du sélénium sont utilisés comme pigments et additifs pour les huiles lubrifiantes dans l'industrie de la peinture. Ils sont également utilisés dans l'industrie du verre et de la céramique pour la décoloration et la pigmentation. Le sélénium est également utilisé dans les domaines de l'agriculture comme fertilisants, ou comme insecticides et finalement, dans l'alimentation des animaux (Bonnard *et al.*, 2011 ; Mehdi *et al.*, 2013).

4.2. Utilisation médicale du sélénium

Le sélénium est également impliqué dans la fabrication de produits pharmaceutiques à usage humain et vétérinaire, comme complément alimentaire dans le traitement des pellicules, de la dermatite et d'autres maladies de la peau. Le Se-sélénométhionine est utilisé pour calculer la demi-vie des plaquettes et du fibrinogène et pour calculer le turn-over des protéines. En outre le sélénoguanine et le sélénoguanosine sont des antimétabolites ayant une activité antitumorale ainsi que leurs dérivés méthylés. Le Sélénium sous forme de sélénite, séléniate et Se-méthionine est utilisé pour le diagnostic de certains cancers (Mehdi *et al.*, 2013).

5. Métabolisme du sélénium

Le métabolisme du sélénium emprunte différentes voies selon la forme chimique de l'élément, sa concentration et la voie d'administration.

5.1. Absorption du sélénium

La principale voie de pénétration du sélénium dans l'organisme est la voie orale, les autres voies peuvent être transcutanées, cutanée et pulmonaire.

L'absorption du sélénium dans l'organisme humain se produit au niveau de l'intestin avec une efficacité variable, dépendante de la forme d'apport du sélénium, du statut adéquat ou non en sélénium et de la présence ou non d'autres aliments. En effet les composés organiques ainsi que le sélérate sont mieux absorbés que le sélérite (Ducros et Favier, 2004).

La sélénométhionine, mieux absorbée que le sélérite l'est par un mécanisme actif analogue à celui de la méthionine. Le sélérite est absorbé par simple diffusion mais son absorption est stimulée par la présence de nutriments à groupements thiols comme la cystéine ou le glutathion. Le sélérate, pratiquement aussi bien absorbé que la sélénométhionine par un mécanisme de transport actif identique à celui des sulfates. Le sélérate et la sélénométhionine sortent de l'entérocyte inchangés, alors que le sélérite est métabolisé. L'ensemble des formes organiques et inorganiques du sélénium peuvent être utilisées par l'organisme mais leur métabolisme est différent (Ducros et Favier, 2004 ; Reilly, 2006). En effet, l'absorption du sélénium augmente en présence des protéines, de la vitamine E et A et diminue en présence des sulfates, de l'arsénique, du mercure et de la vitamine C (Fairweather, 1997 ; Navarro-Alarcon et Cabrera-Vique, 2008).

5.2. Transport du sélénium

Après absorption, les composés séléniés sont fixés aux globules rouges et aux protéines plasmatiques. L'albumine est la protéine de transport majoritaire qui va distribuer le sélénium aux différents organes tel que le foie et les reins et la rate ; 40 à 50 % du pool total de l'organisme sont incorporés dans les muscles striés sous forme de sélénométhionine (Navarro-Alarcon et Cabrera-Vique, 2008).

En effet le sélénium ingéré est lié d'abord à l'albumine qui le transporte vers le foie, où le Sélénium est libéré et sert à la synthèse de sélénotéines, notamment la SeP ou la sélénotéine P est ensuite libérée dans le sang pour devenir lui-même un transporteur du sélénium, entre le foie et divers autres organes et tissus.

Le foie est l'organe contenant le taux le plus élevé en Se, suivi des reins. Ces organes sont les deux principaux lieux de synthèse de la plupart des sélénoprotéines, en particulier la SeP et la GPx cellulaire dans le foie et la GPx extracellulaire dans les reins (Suzuki *et al.*, 2009 ; Thiry *et al.*, 2012).

5.3. Métabolisme du sélénium

Le sélénium est stocké sous forme de SeMet au niveau des tissus qui présentent un taux élevé de synthèse protéique en particulier les muscles squelettiques (Schrauzer, 2000). La SeMet peut donc remplacer de manière non spécifique la Met dans les protéines musculaires pour former des protéines secondaires (Ducros et Favier, 2004 ; Navarro et Cabrera, 2008).

Pour les autres formes du Sélénium ne peuvent pas être stockées et elles entrent dans la voie de la synthèse de sélénoprotéines. Cela nécessite la transformation de l'espèce d'origine en séléniure d'hydrogène (H₂Se) (ou son équivalent), le précurseur commun des sélénoprotéines pour toutes les sources nutritionnelles du sélénium et en même temps, le point de contrôle intermédiaire pour l'utilisation et l'excrétion de cet élément (Suzuki *et al.*, 2006 ; Suzuki *et al.*, 2006b).

La réaction de formation de séléniure dépend de la forme originale de Se. Le sélénite peut être directement réduit en séléniure par le glutathion cellulaire (GSH). Cette réaction se produit dans les globules rouges, immédiatement après le passage du sélénite à travers la membrane intestinale. Le séléniure synthétisé est ensuite transporté vers le foie et où il est réduit par la suite en sélénite et séléniure. Les espèces organiques du sélénium atteignent aussi le foie et subissent leur transformation (Suzuki *et al.*, 2006, 2008).

Il est intéressant de mentionner que les SeCys provenant des aliments ne peuvent pas être utilisés immédiatement pour la synthèse de sélénoprotéines, mais doivent être digérés et transformés en H₂Se afin de synthétiser des molécules de nouveaux SeCys qui seront incorporées aux sélénoprotéines (Suzuki *et al.*, 2006).

5.4. Elimination du sélénium

Le sélénium est éliminé surtout sous forme de dérivés méthylés par les reins (environ 60 %) (Lebreton *et al.*, 1998), cependant une fraction importante (40%) est éliminée par le pancréas. Les poumons constituent une voie d'élimination mineure sous forme de diméthyl-séléniure qui n'intervient qu'en cas de forte absorption, en cas d'apports faibles son excrétion est réduite et il y a une conservation du sélénium qui sera dirigé vers les organes prioritaires (cerveau, organes

reproducteurs et glandes endocrines). Tandis que le contenu cellulaire en GPx diminue rapidement (Ducros et Favier, 2004 ; Steinbrenner et Sies, 2009).

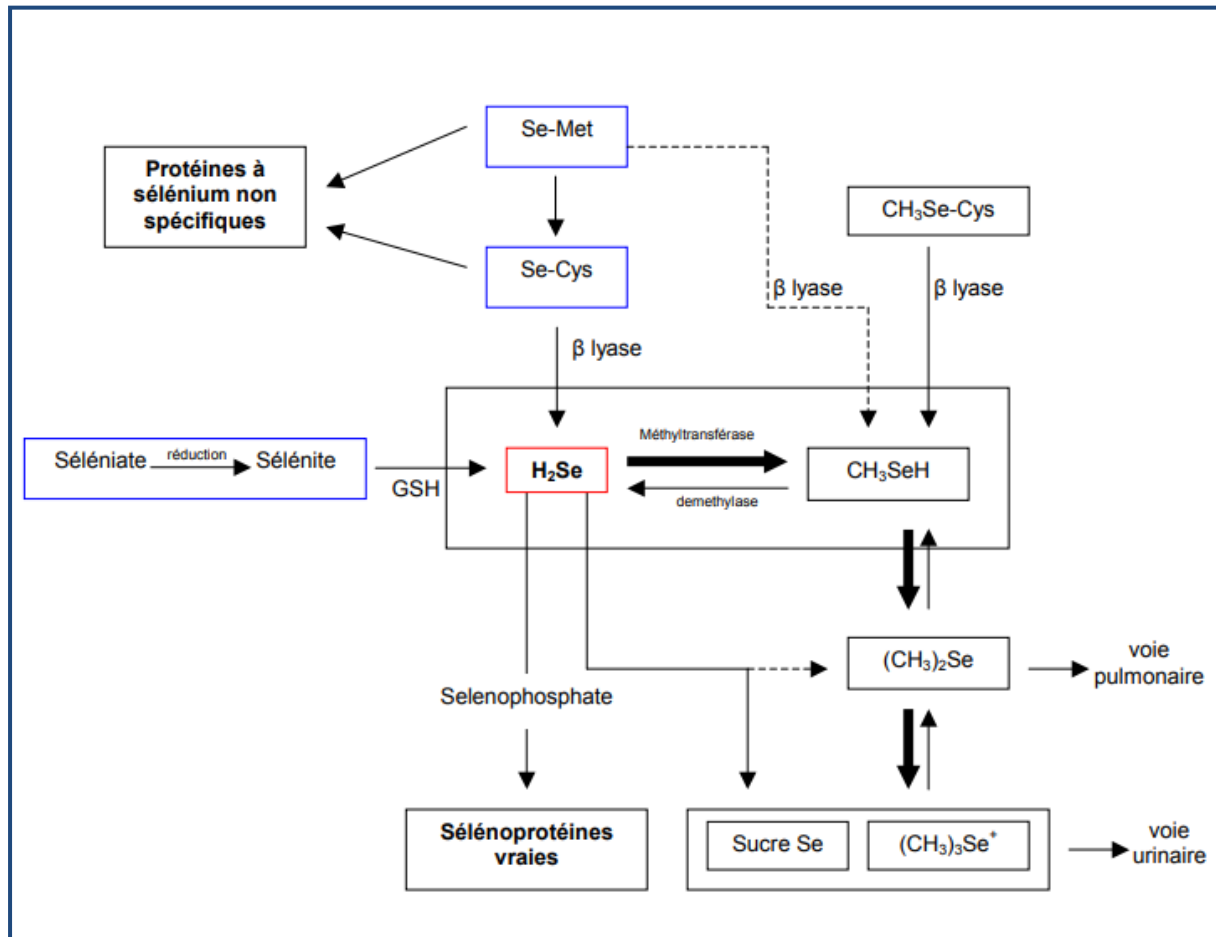


Figure 9. Schéma simplifié du métabolisme cellulaire du sélénium (Adapté de Ducros et Favier (2004), Suzuki et al (2006)).

6. Carence et toxicité du sélénium

Le sélénium est un micronutriment dont la carence et les concentrations toxiques sont très proches les unes des autres. Par conséquent, il est important de connaître son abondance ou sa carence dans les nutriments ainsi que dans les régimes alimentaires afin d'assurer le bon équilibre chez l'homme ou chez l'animal. En général, les estimations de la teneur totale en éléments d'un aliment donné ne sont pas fiables et la biodisponibilité de l'élément nutritif doit être prise en compte ; à dose faible il est un nutriment essentiel à la vie des animaux et des humains, par contre à doses élevées, il devient toxique (Thérond, 1997).

En pathologie humaine, il y a peu d'intoxications au sélénium, par contre les carences sont fréquentes. Les propriétés antiprolifératives des composés du sélénium sont directement liées à leur toxicité (Allessio, 1993). L'OMS considère que le sélénium inorganique est plus toxique que le sélénium organique et recommande 40 à 70 µg sélénium /jour (Zhang et al., 2014). Les intoxications chroniques ou aiguës par le Sélénium du fait de l'alimentation sont rares chez l'homme. La dose létale (DL50) est fixée chez l'homme entre 500 mg et 1 g de sélénium sous forme minérale (sélénite ou sélénate de sodium) (Roussel et Favier, 2009). En effet, la toxicité en Se dépend du composé en sélénium, du mode d'administration, de l'espèce animale, du temps d'exposition, de l'état physiologique et de l'interaction avec d'autres métaux... etc (Navarro et Cabrera, 2008).

La carence en sélénium a également été impliquée dans l'incidence des troubles cardiaques (maladie de Keshan), des troubles osseux et articulaires et des effets néfastes sur le métabolisme des hormones thyroïdiennes, ce qui affecte la croissance et le développement (Fordyce, 2013, Loscalzo, 2014). En outre la carences en Sélénium est également liée à l'instabilité génomique (Arigony et al, 2013). De plus, le sélénium est capable d'effectuer des modifications épigénétiques par la méthylation de l'ADN et la modification des histones (Speckmann et Grune, 2015).

CHAPITRE 4. APERÇU BIBLIOGRAPHIQUE SUR LA PLANTE ETUDIÉE

1. Généralités

La famille des Lamiaceae est une des plus larges familles de végétaux dans le monde. Elle regroupe 250 genres et 6700 espèces différentes dont plusieurs sont d'une grande importance économique mondiale à cause de leur utilisation comme herbes culinaires et médicinales (Miller et al., 2006). La littérature scientifique estime que la famille des Lamiaceae représente une source diversifiée des plantes fortement employées en phytothérapie à cause de leur composition riche en acides phénoliques ; puissants principes actifs qui confèrent un pouvoir thérapeutique aux plantes (Zgorka, 2001). Plusieurs genres appartenant à cette famille ont été étudiés, y compris le genre *Thymus*.

2. Le genre *Thymus*

Le nom *Thymus* provient du nom grec : *Thumos*, racine du mot grec (*theo*) parfum ou aromatique. Le genre *Thymus* est l'un des genres les plus diversifiés de la famille des *Lamiaceae* (Hazzit et al., 2006 ; Naghibi et al., 2005). Il existe près de 350 espèces de thym réparties dans le monde et environ 110 espèces différentes du genre de *Thymus* se concentrent dans le bassin méditerranéen ou il est représenté par onze espèces dans la flore algérienne (Hazzit et al., 2009 ; Amarti et al., 2011). L'Algérie est l'un des pays les plus riches en variétés d'espèces du *Thym* (Kabouche et al., 2005). Il est représenté par 26 espèces botaniques dont l'identification reste délicate en raison de leur variabilité et leur tendance à s'hybrider facilement (Bendif et al., 2017). Parmi elles, certaines sont endémiques de l'Algérie telles que *Thymus pallescens* de Noé, *Thymus dreatensis* Batt., *Thymus guyonii* de Noé et *Thymus lanceolatus* Desf.. D'autres sont endémiques du nord-africain comme *Thymus ciliatus* Desf., *Thymus fontanesii* Boiss. et Reut., *Thymus numidicus* Poiret., *Thymus munbyanus* Boiss et Reut et *Thymus algeriensis* Boiss et Reut (Hazzit et al., 2006 ; 2009 ; Bekhechi et al., 2007).

2.1. Caractéristiques du genre *Thymus*

Le thym est une plante sous-ligneuse, odorante qui forme des touffes compactes très ramifiées qui s'élèvent à une vingtaine de centimètres au-dessus du sol. Il pousse de façon spontanée sur les coteaux secs et rocaillieux et dans les garrigues. Les feuilles du thym sont plus ou moins contractées et les inflorescences sont en faux verticilles. Le calice quant à lui est tubuleux et la corolle est plus au moins exserte (Quezel et Santa, 1963). Toutes les espèces du genre *Thymus* sont riches en huiles

essentielles (Bousmaha-Marroki et al., 2007) et se caractérisent par une grande variabilité chimique (Dob et al., 2006). Parmi elles, certaines sont endémiques de l'Algérie telles que *Thymus pallescens* de Noé, *Thymus dreatensis* Batt., *Thymus guyonii* de Noé et *Thymus lanceolatus* Desf.. D'autres sont endémiques du nord-africain comme *Thymus ciliatus* Desf., *Thymus fontanesii* Boiss et Reut., *Thymus numidicus* Poiret. *Thymus munbyanus* Boiss et Reut et *Thymus algeriensis* Boiss et Reut (Hazzit et al., 2006-2009 ; Bekhechi et al., 2007). Parmi ces espèces l'espèce ; *Thymus munbyanus* subsp. *coloratus* (Lamiaceae), a fait l'objet de cette étude cette espèce se présente comme un petit arbuste endémique d'Algérie et du Maroc, largement répandue dans les pelouses, les rocailles et les régions montagneuse.

2.3. Description botanique de *Thymus coloratus*

Thymus ciliatus (Desf) Benth : ce taxon se distingue des autres sous espèces décrites par les feuilles florales plus ou moins tachées pourpre au moins à la base (Quezel et Santa, 1963). C'est une plante aromatique endémique se trouvant sous forme d'un sous-arbrisseau très ramifié à la base et très feuillu présentant un polymorphisme marquant (Hazzit et al., 2006).

Cette espèce peut atteindre 40 centimètres de hauteur, pouvant former des touffes bien étalées sur sol. Les petites feuilles florales sont peu dilatées et opposées, sans stipules, courtement pétiolées, oblongues, glabres, mais généralement ciliées à la base et un peu enroulées sur les bords colorées (Hans, 2007). Les feuilles sont sessiles, elliptiques, lancéolées. La tige généralement tétra-angulaire est très ramifiée et ligneuse en sa partie inférieure. Cette espèce pousse autour du bassin méditerranéen et dans le Nord Algérien, au printemps qui se caractérise par des jours courts, un climat humide et une température moyenne (Bousmaha-Marroki et al., 2007). Elle est rencontrée dans les pelouses, les broussailles, matorrals, sur substrats calcaires et siliceux et sur les sols rocailloux et dans les régions montagneuses (Hans, 2007).

Le *Thymus ciliatus* est rencontré sous la forme de trois ssp : la ssp *euciliatus*, la ssp *coloratus* et la ssp *munbyanus* (Bousmaha-Marroki et al., 2007).

- Sous-espèce *coloratus*

La ssp *coloratus* (Boiss et Reut) Batt est un sou arbrisseau à capitule dense, gros et à feuilles florales plus ou moins tachées de pourpre au moins à la base. Les fleurs ne dépassant pas 7 à 8mm et sont en général pales comparativement aux autres espèces (Quezel, et Santa, 1963 ; Bousmaha-Marroki et al., 2007 ; Kholkhal, 2014).

- **Sous-espèce *eucliatus***

La ssp *eucliatus* Maire se distingue par de très grandes fleurs rouges ou violacées dépassant < 1cm de long, ses feuilles sont linéaires ciliées sur les marges, florales ovales et vertes, préférant les pelouses buissons, il est répandu dans toutes l'Algérie (Quezel, et Santa, 1963 ; Bousmaha et al., 2007 ; Kholkhal, 2014).

- **Sous-espèce *munbyanus***

- *Thymus munbyanus* subsp. *coloratus* (Boiss. & Reut.) Greuter & Burdet. se caractérise par des feuilles florales vertes (Bousmaha- Marroki et al., 2007).

2.3.1. *Thymus munbyanus* subsp. *coloratus* (Boiss. & Reut.) Greuter & Burdet

Thymus munbyanus subsp. *coloratus* (Boiss. & Reut.) Greuter & Burdet, est un petit arbuste endémique d'Afrique du Nord (Maira et al., 2019), appartient à la famille des Lamiaceae connue par sa richesse en produits du métabolisme secondaire, y compris les composés phénoliques, flavonoïdes et terpenoïdes (Kholkhal, 2014) et en huiles essentielles, caractérisées par deux chémotypes thymol et carvacrol (Benchabane et al., 2012).

2.3.2. Noms vernaculaires

Thymus munbyanus subsp. *coloratus* (Boiss. & Reut.) Greuter & Burdet possède différentes appellations qui sont les suivantes :

Nom français : *Thym* (Trabut, 1935).

Nom arabe : *Zaitra* (Quezel et Santa, 1963) ; *Zaateur* (Trabut, 1935).

Nom berbère : *Djertil* (Trabut, 1935 ; Quezel et Santa, 1963).



Figure 9. *Thymus munbyanus subsp. coloratus*

2.3. Description botanique de *Thymus munbyanus* Boiss. et Reut.

Sous-arbrisseau vivace, assez robuste et touffue avec des racines noueuses et tortueuses, herbacées au sommet très diffuses, petit à moyen mesurant de 10 à 40 cm de haut et très odorant (Thierrey, 2005). Allant du vert (à l'ombre) au gris blanchâtre (en pleine soleil), ses feuilles sont très petites, sessiles, ovales, linéaire ou linéaire-lancéolées, duveteuses au revers, lisses à l'avant et enroulées sur les bords (Grunwald et Christof, 2004).

La floraison est visible entre avril et septembre. Elles sont bleu-violettes voir rouge clair, réunis en glomérules (Bendif, 2017).

L'ensemble constitue des grappes terminales feuillées, à calice tubuleux avec deux lèvres : la supérieure à 3 dents, l'inférieure à deux, ciliées et dentées. La corolle plus ou moins exserte à deux lèvres, à 2 et 3 lobes. Les étamines sont au nombre de quatre saillantes et plus ou moins divergentes (Quezel et Santa, 1963). Le fruit se compose de quatre akènes ovoïdes arrondis (Bendif et al., 2017).

2.4. Aires de répartition

- **Dans le monde :** les plantes faisant partie au genre *Thymus* forment le groupe de plantes le plus important et le plus diversifié de la famille des lamiacées (Belmalha, 2015).

Il comporte 350 espèces réparties dans les 4 coins du monde, plusieurs espèces endémiques existent au niveau de l'Europe du sud, l'Asie de l'ouest et l'Afrique nord-ouest (Algérie, Maroc,

Tunisie et Libye). Certaines espèces sont aussi présentes dans les montagnes d’Ethiopie, Arabie du sud-est, Egypte, Sibérie et Himalaya (Dob et al., 2006).

La région méditerranéenne constitue le centre de domestication principale du *Thym*, avec la présence de 110 espèces locales appartenant au genre *Thymus* (Nickavar et al., 2005).

- **En Algérie :** l’Algérie, pays méditerranéen situé au niveau de l’Afrique du nord possède un étendu floristique très diversifié et riche en plantes aromatiques et médicinales sauvages et spontanées (Miara et al., 2019).

Grace à l’étendue de sa superficie et la diversité de ses écosystèmes l’Algérie est considérée comme un des pays les plus riches en plantes du genre *Thymus*. Elle compte plus de 20 différentes espèces botaniques (Bendif, 2017).

Le taxon ; *T. munbyanus* avec ses multiples sous-espèces est une plante qui caractérise les écosystèmes Algéro-Marocains. Il se localise principalement au niveau de zones arides et sèches (Miara et al., 2019).

2.5. Métabolites secondaires identifiées dans le genre *Thymus*

Des investigations phyto-chimiques réalisées sur le genre *Thymus* ont révélé la présence de plusieurs composés bioactifs, y compris ; les acides phénoliques, les flavonoïdes, les tannins, stérols, stéroïdes, hétérosides stéroïdiques et les huiles essentielles (Boros et al., 2010 ; Zeghib, 2013 ; Kholkhal, 2014).

2.5.1. Les acides phénoliques

Principalement l’acide rosmarinique, qui est considéré comme l’un des plus importants polyphénols antioxydants dans le *Thym* et il est aussi largement trouvé dans les plantes de la famille des Lamiaceae (Petersen et Simmonds, 2003 ; Pacifico et al., 2016). Il a la capacité de freiner le développement des pathologies causées par un excès de radicaux libres (maladies cardiovasculaires et dégénératives). D’autres effets lui sont attribuer ; anti-inflammatoire, anti-mitogène et il est impliqué dans la prévention de certaines maladies neurologiques notamment la maladie de l’Alzheimer (Rubió, 2012).

Le genres *Thymus* riche en acides phénoliques dérivés de l’acide caféique tel que l’acide rosmarinique, l’acide carnosique, acide chlorogénique et l’acide caféique et l’acide chlorogénique (Achour et al., 2012., Zeghib, 2013 ; Ziani et al., 2018), et d’autres acides phénoliques tel que,

acide gallique ; p- Acide coumarique, acide syringique, et l'acide gentisique (Reichling et al., 2008; Justesen., 2000 ; Ozgen et al., 2011 ; Nagy et al., 2011).

2.5.2. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes se répartissent en plusieurs classes de molécules, dont les plus importantes sont les flavones, les flavonols, les flavanones, les dihydroflavonols, les isoflavones, les isoflavanones, les chalcones et les anthocyanes. Plusieurs études ont montré que le *Thymus* est riche en flavonoïdes, y compris :

2.5.2.1. Les flavones comme par exemple : l'apigénine, apigenin-6,8-C-dihexoside, lutéoline, lutéoline-O-glucoside, lutéoline-O-rutinoside, luteolin-3-O-glucoside (Ziani et al., 2019), thymusine et thymonine (Marin et al., 2005 ; Horwath et al., 2008).

2.5.2.2. Les flavanones : la naringénine, hespéridine, eriodiocyol et l'eriocitrine (Kulisic et al., 2006 ; Fecka et Turek., 2008).

2.5.2.3. Les flavonols et dihydroflavonols : la quercétine, rutine, isorhamnétine et l'aromadendrine (Hossain et al., 2010 ; Lee et al., 2011 ; Ziani et al., 2019).

2.5.3. Les huiles essentielles

Les constituants majoritaires dans l'HE de thym sont le thymol et le carvacrol ainsi que d'autres monoterpènes et triterpènes (Zeghib, 2013). En Algérie, les composés majoritaires de l'huile essentielle de *Thymus munbyanus* subsp. *coloratus* selon l'étude de Bendif et al (2017) ; bornéol, camphor, camphène, myrcène, 1,8-cineole, α -pinène, germacrene D de carvacrol. Tefiani et al (2015) ont rapporté que le carvacrol représente 71 %. Tandis, qu'au Maroc cette même espèce renferme le Thymol à 44%, le β -Ocymène à 25% et l' α -terpinène à 12.3 %. Cette variation dans les pourcentages des différents composés est justement due aux facteurs climatiques, au stade végétatif de la plante lors de la récolte et à la partie utilisée de la plante (Belmalha, 2015).

2.6. Utilisations Pharmacologiques du *Thymus*

- **En médecine populaire** : l'extrait du thym été préconisé par voie orale pour traiter les dyspepsies et les troubles gastro-intestinales. Par voie externe où il a été appliqué dans le cas des affections de la cavité buccale, des rhumes et des plaies superficielles. Il était aussi utilisé sous forme de bain aromatique ou compressée après infusion comme traitement complémentaire pour

les maladies hivernales et les prurits. L'HE du *Thym* était employée comme composant de base dans les pommades antiseptiques et cicatrisantes ainsi que les sirops antitussifs (Goetz, 2012).

Dans la phytothérapie algérienne, il est utilisé comme, expectorant, antitussif, antiseptique, stomachique, antispasmodique, anthelminthique et diurétique. Les études ont surtout montré une importante activité antioxydante des différentes espèces du genre *Thymus* étudiées ainsi que des activités antimicrobiennes (Kholkhal, 2014).

-Traitement des voies respiratoires et les bronchites et des troubles digestifs (ballonnements épigastriques), l'hypertension, le diabète, les maladies du système endocrinien et en usage externe comme cicatrisants et antiseptiques (Miara et al., 2019).

-Le *Thymus munbyanus* connu par ses activités antioxydantes, antimicrobiennes, anti-inflammatoires et antiprolifératives (Sofiane et al., 2015 ; Bendif et al., 2016).

-L'huile essentielle du *Thym* est douée de propriétés bactéricides très marquée, antifongique, antiproliférative lui conférant la caractéristique antimicrobienne (Bruneton, 2009).

-L'extrait du *Thym* a la capacité de piéger les radicaux libres et de minimiser le stress oxydatif d'où ses propriétés antioxydantes (Sofiane et al., 2015).

PARTIE EXPÉRIMENTALE

CHAPITRE 5. MATERIEL ET METHODES

1. But et objectifs

Le but de notre étude est une ébauche visant à pallier ou atténuer la cytotoxicité du 2,4-D. C'est aussi une quête vers la découverte et l'essai d'une ou plusieurs molécules qui pourraient être disponibles, efficaces à faible dose, d'une innocuité satisfaisante, un mode d'administration convenable, dotés d'un pouvoir antioxydant puissant pouvant ainsi inhiber la toxicité du xénobiotique utilisé.

La sélection de *Thymus munbyanus* est basée essentiellement sur son endémisme et ses utilisations reconnues en médecine traditionnelle, comme remède contre diverses pathologies, ainsi que sa richesse en métabolites secondaires (polyphénols et huiles essentielles). (Partie bibliographique).

Le choix du sélénium s'est basé sur son potentiel hépatoprotecteur affirmé contre un large éventail de xénobiotiques et pour ses propriétés antioxydantes.

Ceci a poussé notre curiosité à se demander ; est-ce que l'infusion de *Thymus munbyanus* utilisée largement en médecine traditionnelle et en phytothérapie et la supplémentation du sélénium sous forme de sélénite de sodium auront un impact positif sur l'élimination des radicaux libres générés suite à une exposition subchronique au 2,4-D provoquant une cytotoxicité ?

Dans un premier temps, l'objectif de ce travail serait dédié à l'étude de la plante choisie : *Thymus munbyanus*

- L'identification des principaux composés photochimiques, en mettant en exergue le pouvoir antioxydant de *Thymus munbyanus*.

- Les dosages colorimétriques des polyphénols, flavonoïdes et tanins.
- L'étude de l'activité antioxydante.

Un second objectif a été d'étudier l'effet de l'infusion de *Thymus munbyanus* d'une part et de la supplémentation en sélénium d'autre part sur des rats traités par le 2,4-D via un protocole expérimental schématisé ci-dessous (figure 17) en mesurant leurs impacts sur :

- Le poids corporel et le poids relatif et absolu des organes.
- L'évaluation de la fonction du foie et des reins via des bilans : hépatique et rénal.
- La peroxydation lipidique à travers le dosage du MDA au niveau des organes nobles (foie, rein et cerveau).

- Les différents systèmes antioxydants (GSH, GPx, SOD, CAT, GST) au niveau des mêmes compartiments précédemment cités.

- L'architecture tissulaire hépatique, rénale et cérébrale en visualisant leurs intégrités.

2. Les produits chimiques

La formulation commerciale de 2,4-D utilisée (Désormone lourd) sous forme de concentré émulsionnable (EC). Elle était dosée à 600g du 2,4 D Acide (Sous forme d'Ester-Butylglycol) par litre de solution commerciale, disponible en Algérie.

Le sélénite de sodium (Na_2SeO_3) a été acheté auprès de *Sigma Chemical Co* (St Louis, France).

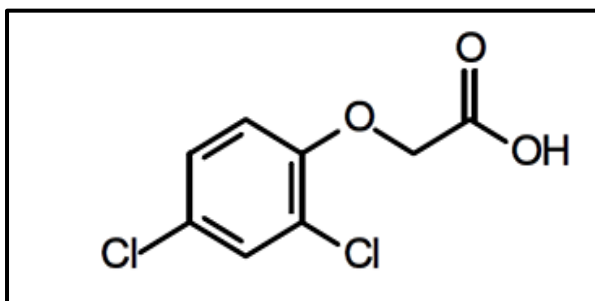


Figure 10. La structure chimique du 2,4-D (acide 2,4-dichlorophénoxyacétique)

3. Matériel végétal

La présente étude a été réalisée sur une plante aromatique de la famille des Lamiaceae, très abondante dans la région Est d'Algérie ; *Thymus munbyanus subsp coloratus*. Les parties aériennes de cette plante (tiges et feuilles) constituent le matériel de choix de notre étude. L'enquête a porté essentiellement sur le nom vernaculaire de la plante, la partie utilisée, le mode de préparation et d'administration et les utilisations thérapeutiques.

3.1. Présentation du site d'échantillonnage

3.1.1. Localisation géographique

La récolte de la plante a été réalisée au niveau des forêts d'Ain Sedjra, wilaya Oum El Bouaghi, région du Nord-Est Algérien dont les coordonnées géographiques sont les suivants : 35.76° d'altitude nord, 7.58° de longitude, et 1200 m d'altitude (figure 11).

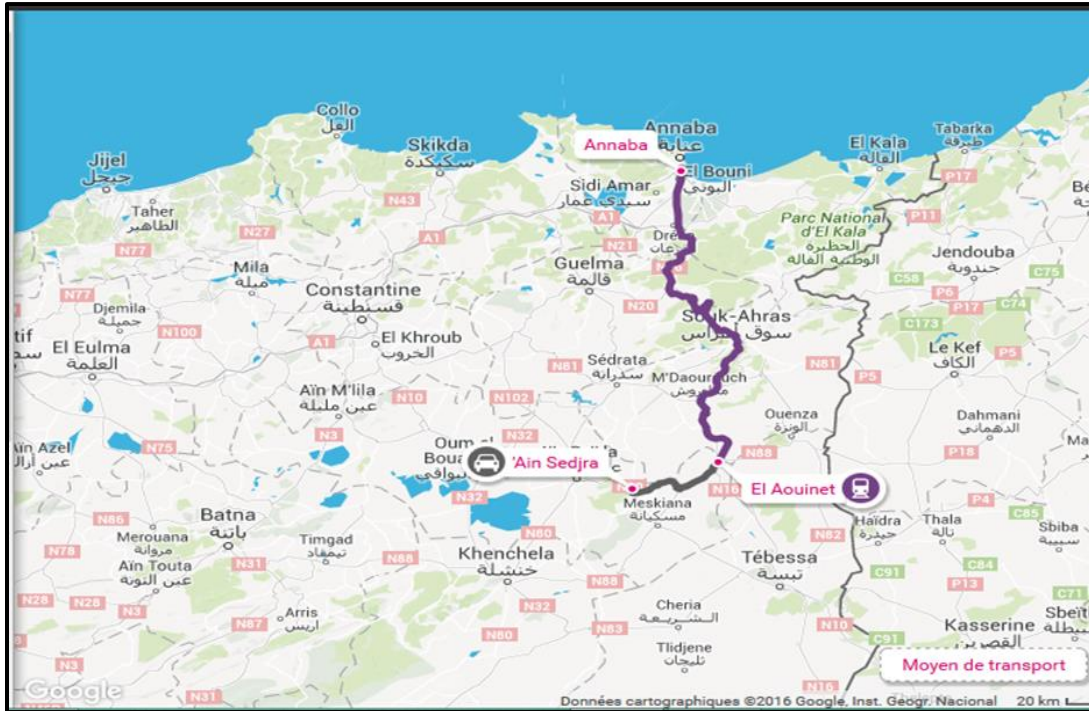


Figure 11. Localisation géographique du site de récolte (www.rome2rio.com).

3.1.2. Caractéristiques climatiques

La région d'Ain Sedjra se caractérise par un climat semi-aride ; avec une température minimale de - 4°C (du mois le plus froids) et une température maximale égale à 40°C (du mois le plus chaud).



Figure 12. *Thymus munbyanus subsp. coloratus* (Cliché prise durant cette étude).

3.2. Préparation de l'extrait

Les parties aériennes de *Thymus munbyanus* ont été récoltées durant le mois de Mai 2017 dans la région montagneuse d'Ain Sedjra Oum Bouaghi Algérie.

L'identification botanique a été faite par Dr. Hamel Tarek (Maître de conférences au département de biologie, Faculté des Sciences, Université Badji Mokhtar Annaba) par le biais de la flore d'Algérie et des régions désertiques méridionales (Quezel et Santa, 1962- 1963). Ces parties ont été rincées à l'eau distillée et le séchage a été effectué à température ambiante, à l'abri de la lumière et de l'humidité puis broyées et conservées dans des flacons en verre.

8 g de la poudre de *Thymus munbyanus* a été bouilli pendant 5 min dans 100 ml d'eau distillée à un rapport de 8/100 (P/V) et laissé infuser pendant 10 min. l'extrait a été refroidi et filtré (Whatman n° 1).

Cet extrait a été préparé quotidiennement. La dose orale de l'extrait était 10 ml/kg/b. w/jour/rat (Hegazy et al., 2018).

3.2.1. Préparation de l'extrait aqueux lyophilisé de *Thymus munbyanus*

L'extrait de la plante a été filtré, congelé et lyophilisé dans un lyophilisateur. La poudre lyophilisée a été stocké à 4° C jusqu'à l'analyse.

- Calcul du rendement

Le rendement de l'infusé a été calculé par la formule suivante : $R (\%) = (M/M_0) \times 100$

Avec : R (%) : Rendement exprimé en % ; M : Masses-en gramme de l'extrait sec résultant ; M₀ : Masse en gramme du matériel végétal à traiter.

3.3. Etude de la composition chimique de *Thymus munbyanus*

3.3.1. Dosage des phénols totaux

Le dosage des polyphénols totaux a été effectué avec le réactif de Folin Ciocalteu selon la méthode colorimétrique citée par Li et al (2007).

Principe :

Le réactif est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique (H₃PW₁₂O₄₀) et d'acide phosphomolybdique (H₃PMo₁₂O₄₀). Il est réduit lors de l'oxydation des phénols en un mélange d'oxyde bleu de tungstène et de molybdène (Ribéreau, 1968). La coloration produite, dont l'absorption maximum est comprise entre 725 et 765 nm, est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits végétaux (Boizot et Charpentier, 2006).

Mode opératoire:

- A un ml de l'échantillon (0,4mg/ml de la plante ajouter 5 ml de réactif de Folin Ciocalteu (FCR) (dilué 10 fois dans de l'eau distillée).
- Incuber pendant 10 minutes à température ambiante.
- Ajouter un volume de 2 ml de Carbonate de sodium (Na_2CO_3 75mg/ml dans l'eau distillée) (Favoriser un milieu alcalin pour déclencher la réaction d'oxydoréduction).
- Incuber le mélange réactionnel pendant 30 minutes à température ambiante et à l'obscurité.
- Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions en utilisant l'acide gallique comme standard à différentes concentrations (0,05 ; 0,1 ; 0,2 ; 0,3 ; 0,4 ; 0,5 ; 0,6 ; 0,7 ; 0,8 ; 0,9 ; 1 mg/ml).
- Les résultats sont lus sur spectrophotomètre à 765 nm contre un blanc.

Expression des résultats :

La concentration des polyphénols totaux a été calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage de l'acide gallique (0-200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) comme standard, dans les mêmes conditions et les mêmes étapes de dosage est exprimée en milligramme (mg) d'équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait (mg d'EAG/g d'extrait).

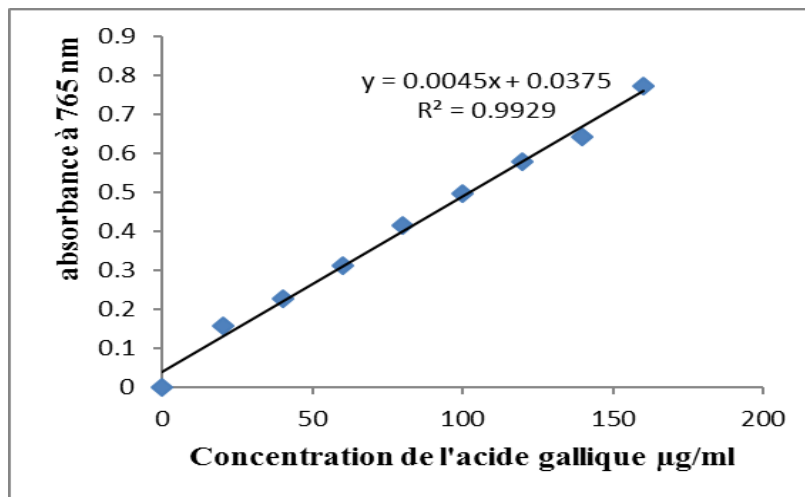


Figure 13. Courbe d'étalonnage de l'acide gallique

3.3.2. Dosage des flavonoïdes totaux

Principe :

Le contenu flavonoïdiques total de chaque extrait est mesuré par une méthode colorimétrique en utilisant le réactif de chlorure d'aluminium ($AlCl_3$). Ce réactif forme un complexe flavonoïdes-aluminium ayant un maximum d'absorption à 430nm (Djeridane *et al.*, 2006).

Mode opératoire :

- 1ml de l'échantillon préparé dans le méthanol avec une concentration de 0.4mg/ml est mélangé avec 1ml d'une solution méthanolique de chlorure d'aluminium (2%).
- Incuber pendant 15 minutes à température ambiante.
- La lecture est faite à 430nm par un spectrophotomètre contre un blanc
- Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant la catéchine comme standard à différentes concentrations

Expression des résultats :

La quantification des flavonoïdes a été faite en fonction d'une courbe d'étalonnages linéaire ($y = ax + b$) réalisé par la quercétine comme standard à différentes concentrations dans les mêmes conditions que l'échantillon.

Les résultats sont exprimés en microgramme d'équivalents de quercétine par milligramme d'extrait (μg EQ/mg).

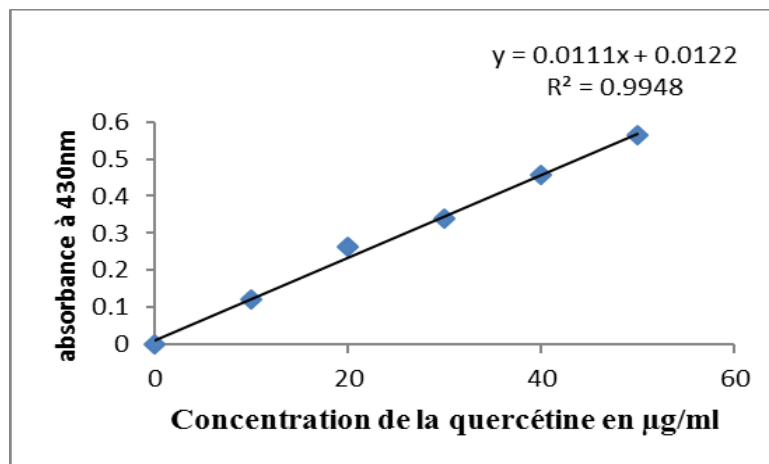


Figure 14. Courbe d'étalonnage de la quercétine

3.3.3. Dosage des tanins condensés

Principe :

Le dosage des tanins condensés est réalisé selon la méthode au trichlorure de Fer (FeCl_3) (Heimler *et al.*, 2006).

Mode opératoire :

- 400 μl de l'extrait est mélangé avec 3 ml d'une solution méthanolique à 4% de vanilline
- Ajouter 1.5 ml d'acide chlorhydrique concentré
- Incuber pendant 15 minutes à température ambiante
- La lecture est faite à 550 nm par un spectrophotomètre contre un blanc

Expression des résultats :

La concentration des tanins condensés est déduite à partir d'une gamme d'étalonnage établie avec la catéchine (0-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) dans les mêmes conditions que l'échantillon. Les résultats sont exprimés en microgramme d'équivalent de catéchine par milligramme d'extrait ($\mu\text{g EC}/\text{mg}$).

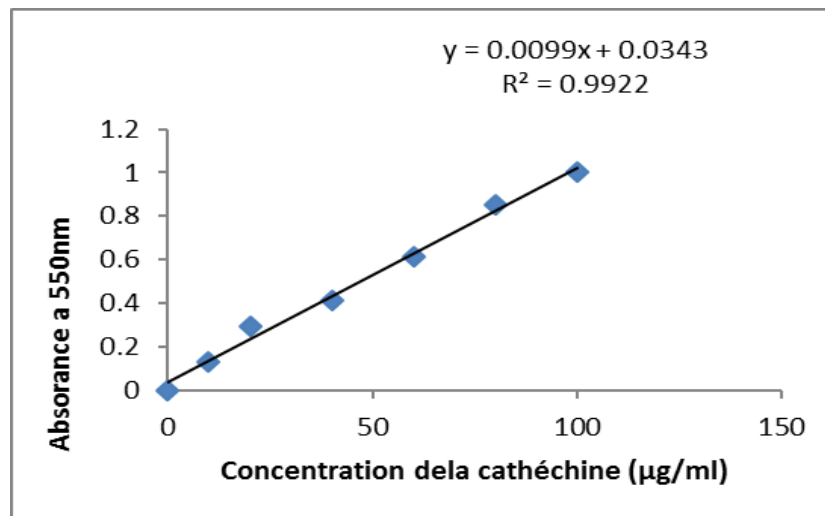


Figure 15. Courbe d'étalonnage de la catéchine

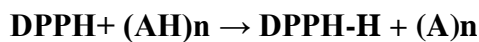
3.4. Etude de l'activité antioxydante *in vitro*

L'évaluation de l'activité antioxydante *in vitro* des extraits de la partie aérienne du *Thymus munbyanus* a été réalisée par trois méthodes à savoir ; le piégeage du radical libre DPPH, blanchiment du β -carotène et la réduction du Fer.

3.4.1. Etude de l'activité antioxydante : Méthode DPPHT

Principe :

Le Diphényle picryl-hydrazyle (DPPH), un radical libre stable, violet en solution et présentant une absorbance caractéristique à 517 nm. Cette couleur disparaît rapidement lorsque le DPPH est réduit en diphényle picryl-hydrazine par un composé à propriété anti radicalaire, entraînant ainsi une décoloration (l'intensité de la coloration est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des protons) (Maataoui *et al.*, 2006). On peut résumer la réaction sous la forme de l'équation :



Où (AH)_n représente un composé capable de céder un hydrogène au radical DPPH (violet) pour le transformer en Diphényle picryl hydrazine (jaune). Ceci permet de suivre la cinétique de décoloration à 517 nm.

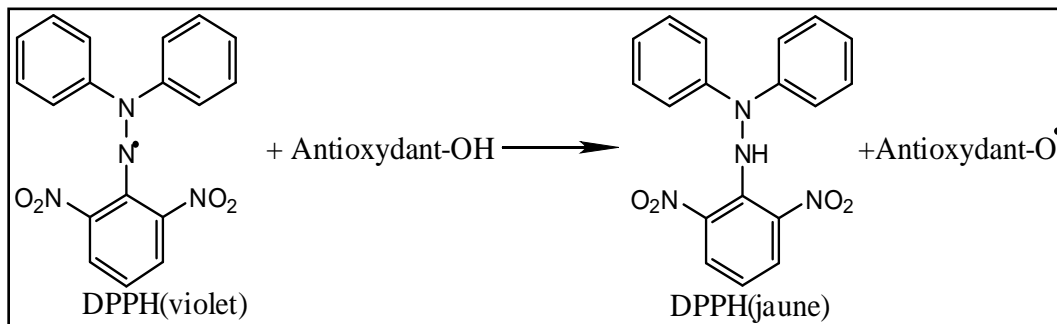


Figure 16. Réaction de piégeage du radical DPPH par le phénol (Congo, 2012).

L'activité du balayage du radical DPPH a été mesurée selon le protocole décrit par (lopez. Lutz *et al.*, 2008)

Mode opératoire:

- Le DPPH est solubilisé dans le méthanol pour avoir une solution (0.3mM).
- Introduit dans des tubes, un volume de 100 μ l de l'extrait de plante (0.1mg/ml dans le méthanol)

- Incubé 30mn avec 1900 µl d'une solution méthanolique de DPPH (2.4mg/ 100ml de méthanol).
- Placé les tubes à l'obscurité à température ambiante pendant 30 minutes.
- Lire l'absorbance à 517 nm.
- Le contrôle négatif est composé de 1900µl de la solution méthanolique au DPPH et de 100 µl de méthanol.
- Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard le BHT.

Expression des résultats :

Les résultats peuvent être exprimés en tant que l'activité antiradicalaire ou l'inhibition des radicaux libres en pourcentages (I%) en utilisant la formule suivante :

$$\% \text{ d'inhibition} = [(\text{Abs Control négatif} - \text{Abs Echantillon}) / \text{Abs Control négatif}]$$

Où

% : pourcentage d'inhibition de l'activité antiradicalaire ;

Abs Echantillon : Absorbance de l'échantillon ;

Abs Control négatif : Absorbance du control négatif ;

Calcul des IC₅₀ :

IC₅₀ ou la concentration inhibitrice de 50% (aussi appelée EC₅₀ pour *Efficient Concentration* 50), est la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50% de radical DPPH.

Les IC₅₀ sont calculées graphiquement par les régressions linéaires des graphes tracés ;

Pourcentage d'inhibition en fonction de différentes concentrations des fractions testées.

3.4.2. Etude de l'activité antioxydante : Méthode de blanchissement du β-carotène

Principe :

La capacité antioxydante de l'extrait de *Thymus munbyanus* est déterminée par la mesure de l'inhibition des composés organiques volatils et les hydroperoxydes conjugués diène résultant de l'oxydation de l'acide linoléique (Tepe *et al.*, 2006). Le β-carotène est un antioxydant lipophile qui protège les acides gras de l'oxydation, l'ajout d'un deuxième antioxydant va permettre sa préservation.

Mode opératoire :

L'activité d'inhibition de la peroxydation lipidique de notre extrait a été déterminée en utilisant le dosage de blanchiment β-carotène, selon la méthode décrite par Amin et Tan (2002).

1 ml de la solution de β -carotène (0.2 mg/ml de chloroforme) a été introduit dans un ballon contenant 0.02 ml d'acide linoléique et 0.2 ml de Tween 20 (100%).

Après évaporation du chloroforme par un rota-vapeur à 40°C pendant 10 min et au résidu, 100 ml d'eau distillée saturée en oxygène ont été ajoutés avec agitation vigoureuse pour former **l'émulsion (A)**.

0.2 ml de l'extrait de *thymus* ((dans l'éthanol à 70% à une concentration finale de 1 mg /1ml) ont été ajouté à des tubes contenant 5 ml de **l'émulsion (A)**. Les tubes ont été agités doucement et placés dans un bain-marie à 45°C pendant 2 heures.

L'absorbance de l'extrait et des antioxydants de références ont été mesurée à 470 nm dans un temps initial(t=0) contre le blanc qui est composé de l'émulsion sans β -carotène.

La cinétique de décoloration de l'émulsion en présence et en absence d'antioxydant est suivie dans des intervalles de temps réguliers (chaque 15min) pendant 120min.

Le contrôle négatif : sans extrait, se composant de 0.2 ml d'éthanol et de 5 ml d'émulsion (A)

Le blanc : Une solution constituant de 0.2 ml d'éthanol et 5ml de **l'émulsion (B)**.

L'émulsion (B) se composant de 0.02 ml d'acide linoléique, 0.2 ml de Tween20 et 100 ml de l'eau distillé

Le contrôle positif : La vitamine C et le BHT ont été employés comme des contrôles positifs, dans les mêmes conditions que l'extrait

L'activité antioxydante a été exprimée en pourcentage et calculée par l'équation suivante :

$$AA (\%) = [1 - (A_{E0} - A_{EtA}) / (A_{C0} - A_{Ct})] \times 100$$

- AA (%) : Activité antioxydante ;
- A_{E0} : valeur de l'absorbance de l'émulsion en présence de l'extrait ou du contrôle positif (vitamine C ou BHT) mesurée à t = 0.
- A_{C0} : valeur de l'absorbance de l'émulsion du contrôle négatif mesurée à t = 0
- A_{Et} : valeur de l'absorbance de l'émulsion en présence de l'extrait ou du contrôle positif (vitamine C ou BHT) mesurée=120mn
- A_{Ct} : valeur de l'absorbance de l'émulsion du contrôle négatif mesurée à t=120 mn

3.4.3. Etude de l'activité antioxydante : Méthode de réduction du Fer : FRAP

Principe :

La méthode est basée sur la réaction de réduction du Fe^{3+} présent dans le complexe ferrocyanure de potassium en Fe^{2+} , la réaction est révélée par le virement de couleur jaune du fer ferrique (Fe^{3+}) en couleur bleu vert du fer ferreux (Fe^{2+}), l'intensité de cette coloration est mesurée par spectrophotométrie à 700 nm.

L'activité réductrice du fer de nos extraits est déterminée selon la méthode décrite par [Pan et al \(2008\)](#).

Mode opératoire:

- Mélangé 1ml de l'échantillon à différentes concentrations (0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.25 mg/ml) avec 2.5ml d'une solution tampon phosphate à 0.2 M (pH= 6.6) et 2.5 ml d'une solution de ferricyanure de potassium $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ à 1%.
- Incuber les tubes à 50°C pendant 20 min
- Refroidir à la température ambiante.
- Ajouter 2.5 ml d'acide trichloracétique à 10% pour stopper la réaction,
- Centrifuger les tubes à 3000g pendant 10 min.
- Ajouter 2.5 ml d'eau distillée et 500 μ d'une solution de chlorure de fer ($\text{FeCl}_3, 6\text{H}_2\text{O}$) à 1% au surnageant.
- Lire l'absorbance contre le blanc à 700 nm.

L'acide ascorbique et le BHA sont utilisés comme contrôles positifs dans cette expérience aux mêmes concentrations choisies et dans les mêmes conditions expérimentales.

Expression des résultats :

Pour explorer les résultats obtenus, la manière la plus commune utilisée par la majorité des auteurs est de tracer les graphes des absorbances obtenues en fonction des différentes concentrations utilisées. L'augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur de l'extrait.

4. Traitement des rats

4.1. Animaux et conditions d'élevage

Dans cette étude, nous avons utilisé 36 rats blancs mâle (*Albinos wistar*), provenant de l'institut pasteur d'Alger, âgés de huit semaines avec un poids de 220 ± 20 g, les animaux sont élevés au sein de l'animalerie du département de Biologie, Université Badji Mokhtar – Annaba. Ils ont été soumis à une période d'adaptation d'un mois environ, aux conditions de l'animalerie, à une température de $22 \pm 2^\circ\text{C}$ et une photopériode de 12 h/12 h. Les rats étaient logés dans des cages en polyéthylène qui sont tapissées d'une litière constituée de copeaux de bois. Les cages ont été nettoyées et la litière changée une fois tous les deux jours jusqu'à la fin de l'expérimentation. Ils ont été nourris avec un concentré énergiquement équilibré (ONAB, Bejaia) dans la composition et détaillée dans l'annexe ([Annexe1](#)). L'eau de boisson est servie dans des biberons ad libitum et renouvelée quotidiennement.

4.2. Répartition et traitement des rats

Les rats ont été répartis en six groupes de six rats chacun, il s'agit de :

- **Lot 1** : Rats témoins recevaient quotidiennement par voie orale un volume de 1 ml d'eau de boisson. Ce traitement s'est poursuivi pendant 30 jours.
- **Lot 2** : Rats recevaient quotidiennement par voie orale l'extrait aqueux de *Thymus munbyanus* (infusion) à raison 10 ml/kg de poids corporels pendant 30 jours. Selon l'étude précédente de [Hegazy et al \(2017\)](#).
- **Lot 3** : Rats recevaient quotidiennement par voie orale du sélénium dissout dans l'eau distillée à raison de 0.2 mg/kg du poids corporels pendant 30 jours ([El-Demerdash et al., 2014](#)).
- **Lot 4** : Rats recevaient quotidiennement par voie orale du 2,4-D à raison de 5mg/kg du poids corporel pendant 30 jours du traitement ([Nakbi et al., 2010](#)).
- **Lot 5** : Rats recevaient quotidiennement par voie orale du pesticide avec la même dose que celle du lot 4 avec la supplémentation en infusion à raison de 10 ml/kg du poids corporel pendant 30 jours.
- **Lot 6** : Rats recevaient quotidiennement par voie orale du 2,4-D avec la même dose que celle du lot 4 avec la supplémentation par voie orale en sélénium à raison de 0.2 mg/kg du poids corporel pendant 30 jours.

La dose de Sélénium (0.2 mg/kg du poids corporel) utilisée dans la présente étude a été choisie en tant que dose effectrice pour fournir une protection élevée contre les conditions de stress dans plusieurs tissus (El-Demerdash *et al.*, 2014) et la dose du pesticide était basé sur l'étude précédente de Nakbi *et al* (2010), dans laquelle (5mg/kg/poids de corporel) du 2,4-D provoque des dommages oxydatifs.

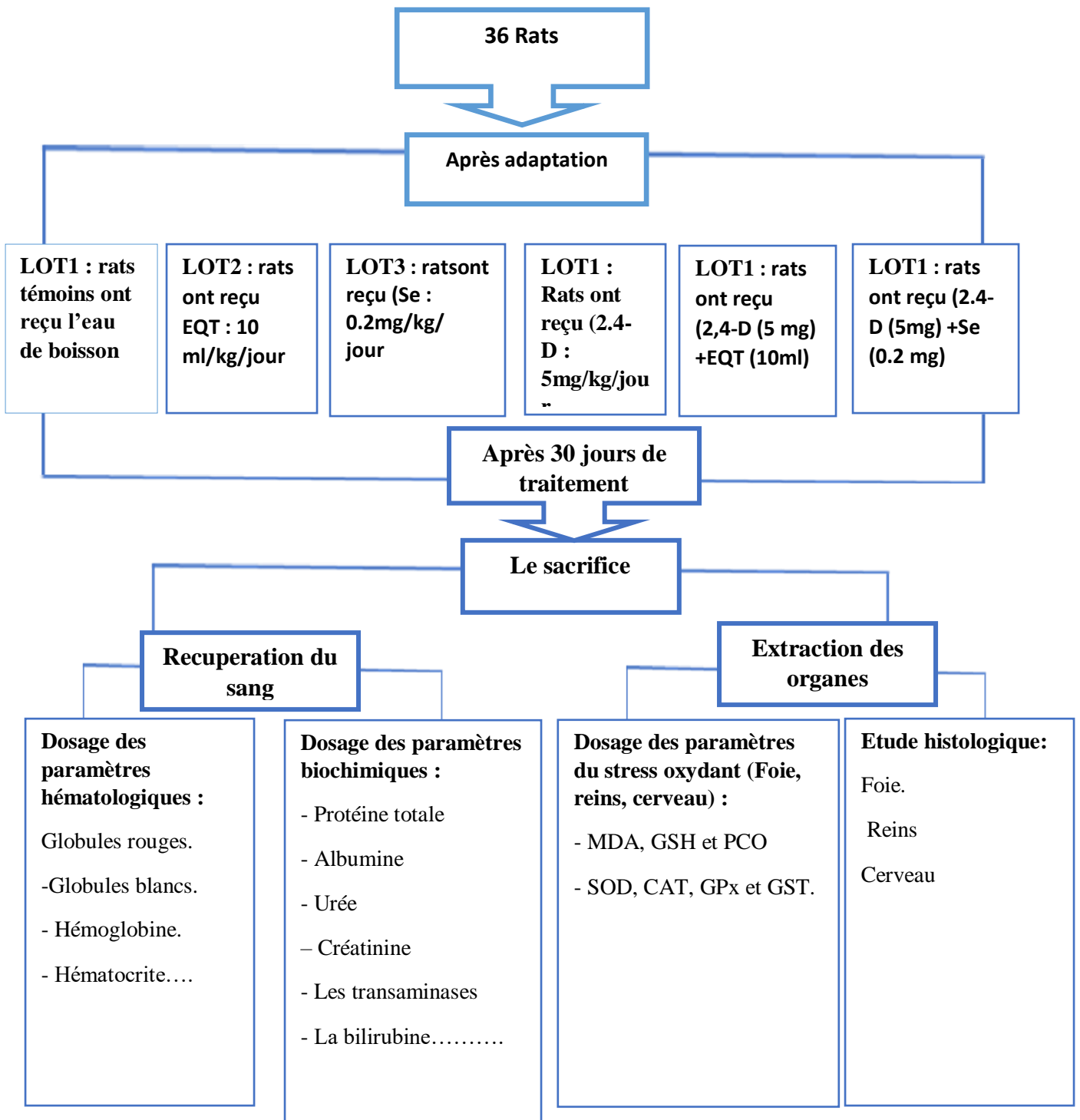


Figure 17. Schéma récapitulatif de l'expérimentation.

5. Sacrifices des animaux

A la fin de période de traitement (un mois), les animaux sont mis à jeun pendant une nuit, le poids des rats après le dernier jour du gavage est noté avant le sacrifice.

5.1. Prélèvement sanguin

Le sang est immédiatement recueilli dans deux types de tubes. Le premier, sec, destiné à une centrifugation à 2500g pendant 15 minutes ; le sérum recueilli a été stocké au congélateur à -20°C jusqu'à l'analyse, le second tube, contenant un anticoagulant (EDTA), est utilisé pour la détermination de la formule de numération sanguine (FNS).

5.2. Prélèvement des organes

Après la dissection, le foie, les reins, le cerveau sont soigneusement prélevés, rincés avec du NaCl à 0.9% puis pesés. Ils ont été stockés selon deux méthodes : la moitié est stockée au congélateur pour la préparation ultérieure de l'homogénat qui a servi au dosage des paramètres du stress oxydant, l'autre moitié fixée dans la solution de formol à 10% afin de réaliser des coupes histologiques.

6. Dosage des paramètres biochimiques : hépatique et rénale

Les différents paramètres biochimiques sont mesurés par la méthode spectrophotométrique en utilisant des kits prêts à l'emploi (coffrets Spinreact utilisés pour le dosage des paramètres : acide urique, créatinine, triglycérides, cholestérol, protéines totales (TB), Albumine (Alb), de la bilirubine total (BT), Les activités enzymatiques sériques de l'aspartate amino-transaminase (ASAT), de l'alanine amino-transaminase (ALAT) et de la phosphatase alcaline (PAL), gamma-glutamyltransferase (γ -GT) et Lactate Déshydrogénase (LDH) selon les principes et les protocoles des kits de dosage (Spinreact, SA, Espagne).

7. Dosage des paramètres hématologique : Formule de Numération Sanguine (FNS)

La formule de numération sanguine (FNS) a été effectuée par un analyseur automatique d'hématologie (Erma Coulter, Inc., model : PCE – 210N.). Les paramètres déterminés sont : globule rouge (GR), globule blanc (GB), hémoglobine (Hb), hématocrite (HT), lymphocytes (LY), monocytes (MO), volume globulaire moyen des hématies (VGM) et la concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (CCMH).

8. Dosage des paramètres du stress oxydatif

8.1. Préparation de l'homogénat de tissus

Un gramme de foie, rein ou cerveau de rats récupérés à partir des six lots étudiés, ont été broyés. Après homogénéisation des tissus dans 2 ml de solution tampon phosphate (TBS : Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7.4) à 1 :2 (P/V), on a procédé à une centrifugation de la suspension cellulaire (9000 g, 4°C, 15 min), puis le surnageant obtenu est aliquoté dans des tubes eppendorfs puis conservé -20°C en attendant d'effectuer les dosages des paramètres du stress oxydant.

8.2. Dosage des protéines

Le réactif de Bradford développe en présence de protéines une coloration bleue quantifiable à 595 nm, et dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de protéines présentes dans l'échantillon.

Principe :

Les groupements amines (-NH₂) des protéines réagissent avec un réactif à base de l'acide ortho phosphorique, de l'éthanol et de bleu de Coomassie pour former un complexe de couleur bleue. L'apparition de cette couleur reflète le degré d'ionisation du milieu acide et l'intensité établit la concentration des protéines dans l'échantillon, elle est mesurée à 595nm (à l'aide d'un spectrophotomètre UV/visible Jenway 6305).

Mode opératoire:

- Prélever 0,1 ml de l'homogénat.
- Ajouter 5 ml du réactif de Bradford.
- Agiter et laisser reposer 5 min pour la stabilisation de la couleur.
- Lire la densité optique à 595 nm, contre le blanc (H₂O à la place de l'homogénat).
- La densité optique obtenue est rapportée sur une courbe d'étalonnage préalablement tracée.

Calcul de la concentration des protéines :

La densité optique obtenue est rapportée sur une courbe d'étalonnage préalablement tracée. La concentration des protéines est déterminée par comparaison à une gamme étalon d'albumine sérique bovine (1 mg/ml) réalisée dans les mêmes conditions (annexe).

8.3. Dosage du glutathion (GSH)

Le dosage du glutathion (GSH) est réalisé selon la méthode de [Jollow et al \(1974\)](#).

Principe :

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

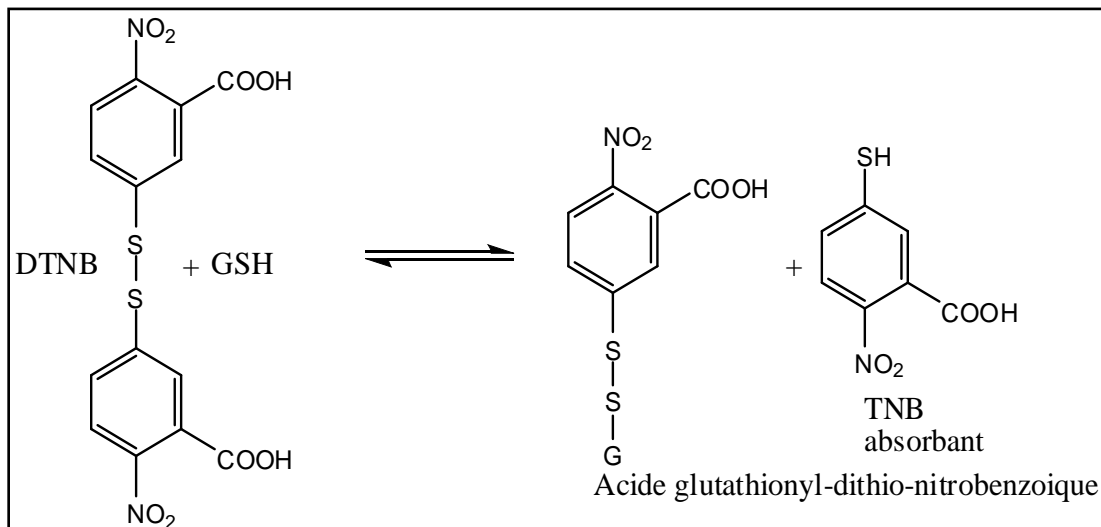


Figure 18. Principe de dosage du glutathion.

Mode opératoire :

La procédure expérimentale du dosage du glutathion est la suivante :

- Prélever 0.8 ml de l'homogénat
- Ajouter 0.2 ml de la solution d'acide salicylique (0.25%)
- Agiter et laisser pendant 15 minutes dans un bain de glace
- Centrifuger à 9000g pendant 5min
- Prélever 0.5 ml du surnageant
- Ajouter 1 ml du tampon Tris-EDTA (contenant 0,02 M d'EDTA, pH 9.6)
- Mélanger et ajouter 0.025 ml de l'acide 5,5dithio-bis-2-nitrobenzoïque (DTNB) à 0.01M.

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

Calcul de la concentration :

La concentration du GSH est obtenue par la formule suivante :

$$\text{GSH } (\mu\text{mol}/\text{mgproteines}) = \frac{\text{DO} \times 1 \times 1.525}{13.100 \times 0.8 \times 0.5 \times \text{mg proteines}}$$

- **DO**: Densité optique
- **1** : Volume total des solutions utilisées de la déprotéinisation (0.8ml homogénat, 0.2ml SSA).
- **1.525** : volume total des solutions utilisées dans le dosage du GSH au niveau du surnageant (0.5 ml surnageant + 1ml tris + 0.025 ml DNTB).
- **13.100** : Coefficient d'absorbance (concernant le groupement –SH à 412 nm).
- **0.8** : Volume de l'homogénat après déprotéinisation.
- **0.5** : Volume de surnageant trouvé dans 1.525 ml.

8.4. Détermination de la peroxydation lipidique par la mesure du taux du malondialdéhyde (MDA) au niveau tissulaire

Le MDA est l'un des produits des réactions de peroxydation lipidique qui se forme lors de l'attaque des lipides polyinsaturés par des espèces réactives de l'oxygène, générées par certains contaminants. Dans notre étude, le niveau de la peroxydation lipidique a été évaluée par le dosage des TBARS d'après la méthode de [Buege et Aust \(1978\)](#), dans le rein, le foie et le cerveau.

Principe :

Le principe de ce dosage est basé sur la condensation de MDA en milieu acide et à chaud avec l'acide thiobarbiturique. La réaction entraîne la formation d'un complexe de couleur rose entre deux molécules d'acide thiobarbiturique, ce produit qui peut être donc mesuré par spectrophotométrie d'absorption à 530 nm.

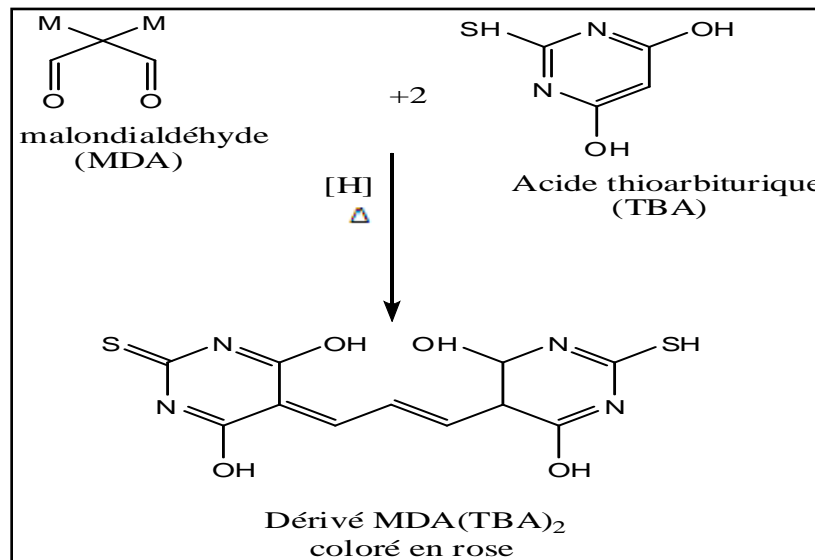


Figure 19. Réaction du dialdéhyde malonique avec l'acide thiobarbiturique.

Mode opératoire:

- Prélever 375 µl de l'homogénat.
- Ajouter 150 µl de la solution tampon TBS (Tris 50 mM, NaCl 150 mM pH 7.4)
- Ajouter 375 µl de la solution TCA-BHT (TCA 20%, BHT 1%).
- Agiter et centrifuger à 9000 g pendant 10 min à 4°C.
- Prélever 400 µl du surnageant
- Ajouter 80 µl du HCl (0.6 M)
- Ajouter 320 µl de la solution : Tris-TBA (Tris 26 mM, TBA 120 mM).
- Mélanger et incuber au bain marie à une température de 80°C pendant 10 min.

Les densités optiques sont mesurées à 530 nm contre le blanc réactif.

Calcul de la concentration du MDA :

La quantité du MDA dans l'échantillon est exprimée en nmol/gramme de protéine, Selon l'équation :

$$\text{MDA (nmol/mg protéines)} = \frac{\text{DO} \times 10^6}{\text{E} * \text{X} * \text{L} * \text{F}_d}$$

- **C** : Concentration en nmol/mg de protéines.
- **DO** : Densité optique lue à 530 nm.
- **E** : Coefficient d'extinction molaire du MDA = $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.
- **L** : Longueur du trajet optique = 0.779 cm.
- **X** : Concentration de l'extrait en protéines (mg/ml).
- **F_d** : Facteur de dilution : $F_d = 0.2083$.

8. 5. Dosage des protéines carbonylées (PCO)

Principe :

Les protéines carbonylées (marqueurs de l'oxydation protéique) sont donc mesurées selon la méthode de [Levine et al. \(1990\)](#), qui se base sur la dérivation du groupe carbonyle avec la 2,4- Dinitrophénylhydrazine (DNPH), ce qui conduit à la formation d'un produit 2,4-dinitrophényl (DNP) hydrazone stable.

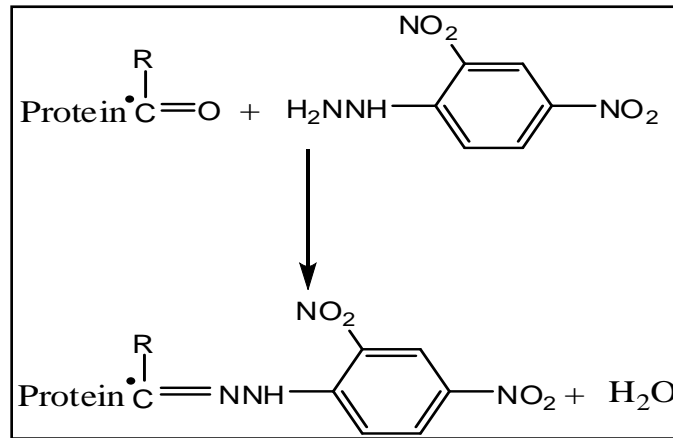


Figure 20. Réaction entre les protéines carbonylées et le DNPH.

Mode opératoire :

- Mélanger : 100 µl de l'échantillon + 500 µl (DNPH (10 mM) incubé dans HCl (2N)
- Agitation
- Incubation des tubes pendant 1 heure (T° ambiante) à l'abri de la lumière : avec vortex chaque 15 mn
- Laisser les tubes sur la glace durant 5 mn
- Ajouter 500 µl TCA (20%)
- Centrifugation pendant 10 min (4°C) à 3000g
- Collecte le précipité protéine (en enlevant le surnageant)
- Lavage du culot 2 fois avec éthanol- acétate d'éthyle (v/v)
- Sécher le culot
- Le précipité final sera dissout dans 600 µl guanidine – HCl (6M)
- Incubation 15 mn à 37 °C
- Vortex et centrifugation pendant 10 mn à 4000 rpm
- Lecture de la DO (370 nm)
- Calcul de la concentration :

La concentration des groupements carbonylés exprimée en micromoles par milligramme de protéines (µmol/mg prot.) selon la formule suivante :

$$\text{Protéines carbonylées (}\mu\text{mol/mg prot)} = \frac{\text{DO}}{\epsilon \times L \times X} \times 106 \times \text{Fd}$$

- **DO** : Densité optique lue à 370 nm.
- **E**: Coefficient d'extinction molaire de DNPH = $2.2 \cdot 10^4 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$.
- **L** : Longueur du trajet optique = 0.779 cm.
- **X** : Concentration de l'extrait en protéines (mg/mL).
- **F_d**: Facteur de dilution.

8.6. Dosage de l'activité enzymatique de la glutathion peroxydase (GPX)

Principe :

L'activité de la GSH-Px est mesurée par la technique de [Floche et Gunzler \(1984\)](#). Cette méthode est basée sur la réduction de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) en présence de glutathion réduit (GSH). Ce dernier est transformé en (GSSG) sous l'influence de la GPx selon la réaction suivante :



Mode opératoire :

- Prélever 0,2 ml de l'homogénat (surnageant) ;
- Ajouter 0,4 ml de GSH (0,1 mM) ;
- Ajouter 0,2 ml de la solution tampon TBS (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7.4)
- Incuber au bain marie à 25°C, pendant 5 min ;
- Ajouter 0,2ml de H₂O₂ (1,3 mM) pour initier la réaction, laisser agir pendant 1 minutes ;
- Ajouter 1 ml de TCA (1%) pour arrêter la réaction ;
- Mettre le mélange dans la glace pendant 30 minutes ;
- Centrifuger durant 10 minutes à 3000 tours /minutes ;
- Prélever 0,48 ml du surnageant ;
- Ajouter 2,2 ml de la solution tampon TBS ;
- Ajouter 0,32 ml de DTNB (1,0 mM) ;
- Mélanger et après 5 minutes lire les densités optiques à 412 nm

Calcul de l'activité enzymatique :

L'activité enzymatique du GPx est exprimée en nano moles de GSH oxydé par milligramme de protéines (nmol GSH/mg prot.t) selon l'équation :

$$\text{GPx } (\mu\text{mol/mg prot.}) = \frac{(\text{DO échantillon} - \text{DO étalon}) \times 0,04}{\text{DO étalon}} + \frac{5}{\text{mg prot.}}$$

- **DO** : Densité optique lue à 412 nm.

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

8.7. Dosage de l'activité enzymatique de la catalase (CAT)

Principe :

Les catalases sont présentes dans un grand nombre de tissus. Ce sont des enzymes tétramériques, chaque unité portant une molécule d'hème et une molécule de NADPH. Ces enzymes interviennent dans la défense de la cellule contre le stress oxydant en éliminant les espèces réactives et en accélérant la réaction spontanée de l'hydrolyse du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) toxique pour la cellule en eau et en oxygène (Aebi, 1984).

La réaction se fait en deux étapes. La réaction bilan est :



L'activité de la CAT est mesurée à 240nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV/visible par la variation de la densité optique consécutive à la dismutation du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂).

Mode opératoire :

Le mode opératoire a été réalisé comme suit :

Réactifs	Zéro (µl)	Blanc (µl)	Essai (µl)
Tampon phosphate (PBS) (100mM, pH 7.4)	1000	800	780
H ₂ O ₂ (0.500 mM)	-----	200	200
Homogénat	-----	-----	20

La quantité de surnageant est déterminée en fonction de la quantité de protéine qui doit être comprise entre 1 et 1,5 mg/ml, soit une quantité de 10 à 20 µl de surnageant dilué. Ensuite, la lecture de l'absorption à 240 nm se fait après 15 secondes de délais et du durant 60 secondes de mesure.

Calcul de l'activité enzymatique :

L'activité enzymatique de la catalase est exprimée en micromoles de H₂O₂ par minute par milligramme de protéines (µmol H₂O₂/min/mg prot.) selon la formule suivante :

$$\text{Catalase } (\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{min}/\text{mg proteins}) = \frac{\Delta\text{DO}/\text{min}}{\epsilon \times L \times X \times Fd}$$

- **ΔDO:** Variation de la densité optique par minutes.

- ϵ : Coefficient d'extinction moléculaire de l'eau oxygénée, $\epsilon_{H_2O} = 0.043 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} = 0,043 \text{ } \mu\text{mol cm}^{-1} \text{ ml}^{-1}$.
- **L** : Largeur de la cuve= 1 cm
- **X** : Quantité de protéines en mg/ml
- **F_d** : Facteur de dilution pour le H₂O₂ dans la solution tampon

8.8. Dosage de l'activité de la superoxyde dismutase (SOD)

L'activité de la superoxyde dismutase (SOD) est déterminée à partir de sa capacité à inhiber la réduction du nitro blue tetrazolium (NBT). L'oxydation du NBT par l'anion superoxyde O²⁻ est utilisée comme base de détection de la présence de la SOD.

Dans un milieu aérobie, le mélange riboflavine/méthionine/NBT donne une coloration bleue, la présence de SOD inhibe l'oxydation de NBT (Beyer et Fridovich, 1987).

Une unité de SOD correspond à la quantité de protéines nécessaire pour inhiber la photo-réduction de 50 %.

Mode opératoire :

Le mode opératoire a été réalisé comme suit :

Réactifs	Blanc (µl)	Essai (µl)
EDTA-Met (0,1 mM, 13 mM)	1000	1000
Tampon phosphate (50 mM) pH 7,8	1000	1000
Echantillon	-----	50
Tampon phosphate	1000	950
NBT (75 µM)	85.2	82.5
Riboflavine (2 µM)	22.6	22.6

Calcul de l'activité enzymatique:

L'activité enzymatique de la SOD est exprimée en unité enzymatique par milligramme de protéines (U/mg de prot.) selon la formule :

L'activité SOD = % d'inhibition /mg de protéine.

$$Y = \frac{DO B - DO E}{DOB} \times 100 \times \frac{20}{\text{mg de prot.}} \times \text{facteur de dilution}$$

Activité spécifique SOD = Y/50 unité de SOD/mg de protéine.

8.9. Dosage de l'acétylcholinestérase (AChE)

Principe :

La méthode utilisée est dérivée de celle d'Ellman (Ellman et al., 1961). En effet l'acétylcholinestérase contenue dans la fraction des tissus va réagir avec l'acétylthiocholine (ASCh) en libérant l'acétate et la thiocholine (Sch). Cette dernière réagit à son tour avec le DTNB (5-5'-Dithio-Bis-nitrobenzoate) en donnant du TNB produit de couleur jaune qui absorbe à 412 nm et dont la concentration est proportionnelle à la quantité d'enzymes présente dans le milieu.

La réaction peut être schématiser ainsi :

Mode opératoire :

Le mode opératoire a été réalisé comme suit :

Réactifs	Essai (µl)	Blanc (µl)
Tampon phosphate	1000µl	1050 µl
DTNB	50 µl	50 µl
Asch	50 µl	50 µl
Echantillon	50 µl	-----

- Les tubes sont bouchés puis agités.
- Incubation pendant 2.5 mn à 25°C dans un bain marie.
- Lecture de la densité optique à un intervalle de temps de 25 min (lecture de la densité optique chaque 3 minutes) à 412 nm contre une solution blanche.
- Les résultats sont exprimés en nmol/min/mg de protéine. L'activité est donnée par la formule suivante :

$$\text{Activité (nmol/min/mg de protéine)} = \frac{\Delta DO / \text{min} \times 1000 \times V_{\text{cyt}}}{\epsilon \times V \times [\text{Protéines}]}$$

- DO : variation de densité optique par minute.
- V : volume de l'échantillon en ml.
- P : mg de protéine par ml de la fraction à doser.
- V_{cyt} : volume de cytosol.
- ε : coefficient d'extinction molaire de l'acétylcholinestérase égale à 13,6 Mm /c.
- / = a : coefficient directeur : y = ax.

9. Étude histologique

Les organes prélevés (foies, reins, cerveau) sont conservés dans le formol (10 %). Les coupes histologiques ont été réalisées au laboratoire d'anatomie pathologique (NIHA) Annaba. La technique utilisée est celle décrite par [Houlot \(1984\)](#).

- Fixation : la fixation a pour but la conservation des structures. Elle s'effectue par immersion, en baignant les échantillons dans le formol (tranché en pièces).
- Déshydratation : la première étape de déshydratation consiste à remplacer l'eau présente dans les organes par de l'éthanol 100%, lequel sera ensuite substitué par du toluène qui lui-même sera remplacé par de la paraffine. Elle s'effectue par immersion dans des bains d'éthanol de concentrations croissantes (de 70°, 95, jusqu'à l'éthanol absolu 100°).
- Inclusion en paraffine des tissus : Elle a pour but de permettre la réalisation de coupes fines et régulières. En effet les tissus sont inclus dans des blocs de paraffine. Des tranches de section de 2 à 5 µm d'épaisseur seront ensuite réalisées grâce à un microtome qui permet de trancher le bloc à l'épaisseur désirée.
- Déparaffinage : il consiste à éliminer la paraffine, les lames sont placées sur une plaque chauffante (à 45-60°C) pendant 15 min, afin d'obtenir la liquéfaction et donc l'élimination de la paraffine.
- Réhydratation : en immergeant les lames dans des bains d'alcool de degrés décroissant (de l'alcool à 100° jusqu'à l'alcool 50°), puis dans l'eau distillée.
- Coloration avec la combinaison entre deux colorants hématoxyline et éosine (HE)

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

- La coloration suit les étapes ci-dessous : déparaffiner et hydrater les lames à l'eau du robinet puis rincer à l'eau distillée. Immerger dans un bain d'Hématoxyline de Harris (15 minutes) qui colore en bleu violacée les structures basophiles (noyaux).
- Différencier les coupes dans l'alcool acide (1 à 2 plongées) ;
- Déposer ensuite les lames dans un bain d'eau du robinet et vérifier la différenciation au microscope.

- Bleuir dans un bain d'eau ammoniacale.
- Immerger dans un bain d'Eosine (15 secondes à 2 minutes) qui colore en rose les structures acidophiles (cytoplasme).
- Tous ces bains sont séparés par des lavages à l'eau du robinet.
- Observation au microscope optique doté d'un appareil photographique.

10. Etude statistique

Pour l'étude *in vitro* les données représentent la moyenne de trois répétitions (Triplicata) indépendantes \pm l'erreur type ($M \pm SEM$).

Les résultats ont été représentés sous forme de moyenne \pm l'erreur type ($M \pm SEM$).

Avec $M = \Sigma x / n$; x signifiant la valeur du paramètre étudié et n c'est le nombre de valeurs.

$$SEM = \text{écart type} / \sqrt{n}.$$

La comparaison entre les différents lots sont effectuées après une analyse de la variance (ANOVA) suivie par le test post-hoc de Tukey pour la comparaison multiple (logiciel GraphPad Prisme 7 (Prism7, version 7.00, GraphPad Software, California USA)).

La différence est significative pour $P < 0.05$ (*).

La différence est hautement significative pour $P < 0.01$ (**).

CHAPITRE 6. RÉSULTATS & DISCUSSION

1. Études phytochimique et activité antioxydante de l'extrait aqueux de *Thymus munbyanus*

1.1. Études phytochimique

Des méthodes spectrophotométriques nous ont permis de déterminer :

- Les teneurs en polyphénols totaux par le réactif de Folin-Ciocalteu, rapporté en milligramme d'équivalent de l'acide gallique par milligramme d'extrait.
- Les teneurs en flavonoïdes par le trichlorure d'aluminium, rapporté en milligramme d'équivalent de la quercétine par milligramme d'extrait.
- Les teneurs en tanins par le test de la vanilline, rapportée en microgramme d'équivalent de la catéchine par milligramme d'extrait.

Les résultats obtenus sont rapportés dans le tableau 5.

Tableau 5. Rendement et teneur en composés phénoliques totaux, flavonoïdes et en tanins condensés dans l'extrait aqueux de *Thymus munbyanus*

Extrait	Rendement %	Polyphénols ($\mu\text{g EAC/mg}$ d'extrait)	Flavonoïdes ($\mu\text{g EQ/mg}$ d'extrait)	Tanins condensés ($\mu\text{g EC/mg}$)
Extrait aqueux	6.43 \pm 0.008	73.14 \pm 1.30	10.05 \pm 0.29	3.43 \pm 0.21

Les valeurs données représentent la moyenne de trois mesures \pm SEM

1.2. Activité antioxydante

La mise en évidence du pouvoir antioxydant de l'extrait de *Thymus munbyanus* a été réalisée par trois méthodes chimiques différentes : le piégeage du radical libre DPPH, le blanchiment du β -carotène et le pouvoir réducteur du Fer.

1.2.1. Méthode DPPH

L'inhibition du DPPH radicalaire a été évaluée pour l'extrait aqueux ainsi que pour les deux témoins positifs : l'acide ascorbique et le BHT.

Les essais ont été réalisés en triplicata et les résultats sont exprimés en valeur d'IC₅₀ \pm SEM.

Les valeurs obtenues ont permis de tracer une courbe du pourcentage d'activité antiradicalaire pour l'extrait. D'après les résultats présentés dans la figure 21, on remarque que l'activité antiradicalaire est dose-dépendante car elle est proportionnelle à l'augmentation de la concentration de l'extrait.

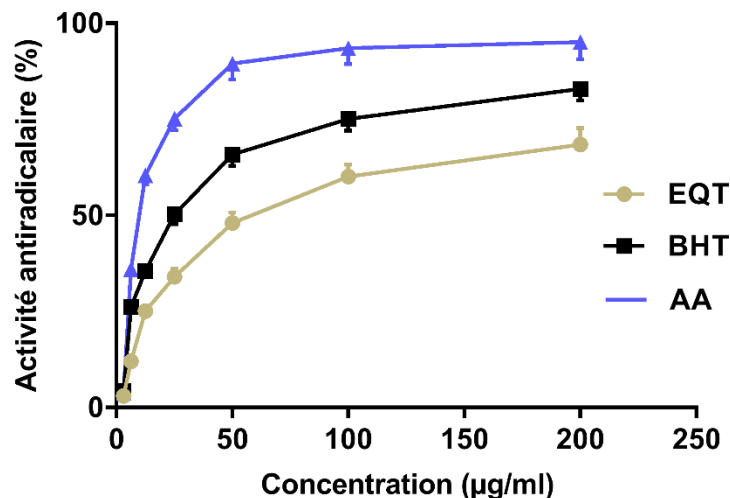


Figure 21. Pourcentage d'activité antiradicalaire de l'extrait aqueux de *Thymus munbyanus*, de l'acide ascorbique et du BHT.

- **Calcul des IC₅₀**

La capacité antioxydante de l'extrait aqueux est déterminée à partir de son IC₅₀, paramètre couramment utilisé pour mesurer l'activité antiradicalaire. C'est la concentration en extrait nécessaire pour réduire 50% du radical DPPH dans une période de temps définie. Une valeur faible d'IC₅₀ correspond à une activité antioxydante élevée de l'extrait (Prakash *et al.*, 2012).

L'IC₅₀ a été calculée par régression linéaire des pourcentages d'inhibition en fonction des différentes concentrations de l'extrait préparé.

La comparaison des IC₅₀ par rapport aux deux témoins positifs montre que l'extrait aqueux possède une activité antioxydante intéressante avec un IC₅₀ = 66.15±1.95µg/ml, le BHT =25.17±0.83µg/ml et l'acide ascorbique = 6.27 ± 0.30 µg/ml.

1.2.2. Méthode de blanchiment du bêta-carotène

Un suivi de la réaction de l'oxydation du β-carotène en présence d'extrait et/ ou des témoins (négatif et positif), a été effectué en mesurant l'intensité de la coloration de la β-carotène à une longueur d'onde de 470 nm, ce qui a permis de tracer une courbe (figure 22). A partir de cette dernière on remarque que l'absorbance du mélange diminue significativement, mais cette diminution reste moins rapide par rapport à celle de la solution témoin (-) et devient sable dans un temps prolongé pour l'extrait aqueux.

L'antioxydant standard (BHT) a présenté une activité d'inhibition de la décoloration du β -carotène remarquable avec le pourcentage d'inhibition de l'ordre de 80.95 %. Tandis l'extrait aqueux de *Thymus munbyanus* a enregistré un pourcentage de 66.84%.

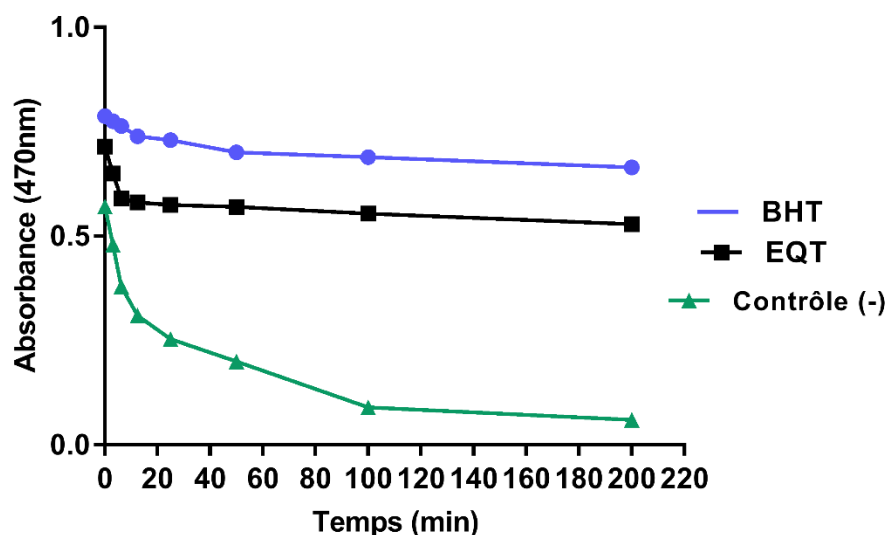


Figure 22. Cinétique de l'inhibition de blanchissement du β -carotène par extrait de *Thymus munbyanus*, du contrôle positif BHT et du contrôle négatif.

La comparaison des IC_{50} par rapport au contrôle positif, montre que l'extrait aqueux possède une activité d'inhibition de blanchissement du β -carotène remarquable avec un $IC_{50} = 21.08 \pm 0.95 \mu\text{g/ml}$, le BHT $= 3.15 \pm 0.01 \mu\text{g/ml}$.

1.2.3. Pouvoir réducteur du fer (FRAP)

Dans ce test, la présence d'un réducteur (antioxydant) dans l'extrait à tester va réduire le complexe Fe^{3+} /ferricyanide [$\text{FeCl}_3/\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$] à la forme ferreuse (Fe^{2+}) qui s'accompagne par le passage de la couleur jaune à la couleur verte ou bleue qui va absorber à la longueur d'onde de 700 nm, ainsi, une couleur intense signifie un puissant effet réducteur (Oliveira et al., 2008).

La figure 23 révèle la capacité de réduction est proportionnelle à l'augmentation de la concentration de l'extrait qui possède un potentiel réducteur dose-dépendant à partir de $3.25 \mu\text{g/ml}$ jusqu'à $60 \mu\text{g/ml}$, tandis que le BHT montre une activité réductrice à partir à $6.25 \mu\text{g/ml}$ et l'acide ascorbique avec un pouvoir réducteur à partir $0.78 \mu\text{g/ml}$.

La valeur EC_{50} est la concentration de l'échantillon qui correspond à une absorbance égale à 0,5 et qui est calculée à partir du graphe de l'absorbance en fonction de la concentration de l'échantillon.

EC_{50} pour l'acide ascorbique $9.03 \pm 0.49 \mu\text{g/ml}$; l'extrait aqueux de *Thymus munbyanus* $50,44 \pm 1.55 \mu\text{g/ml}$ et pour le BHT $51.62 \pm 1.14 \mu\text{g/ml}$.

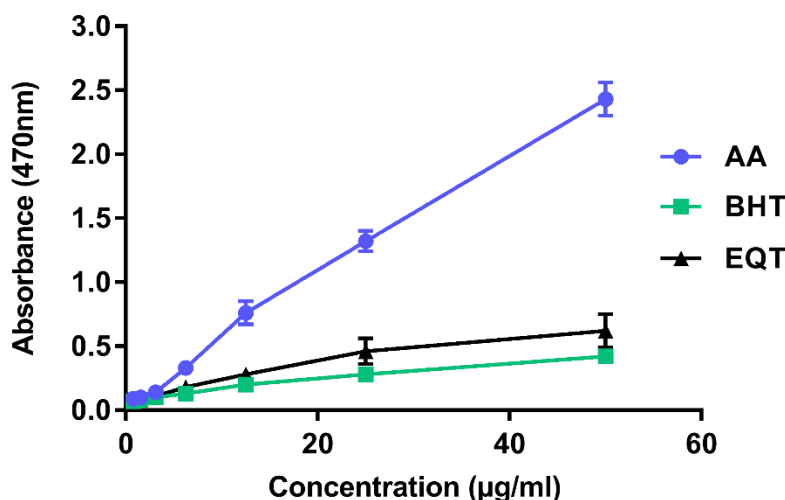


Figure 23. Pouvoir réducteur de l'extrait aqueux, de l'acide ascorbique et du BHT

Discussion

Un intérêt accordé aux antioxydants naturels d'origine végétale est observé ces dernières années en raison de leurs capacités biologiques prometteuses pour protéger le corps humain contre les effets néfastes des radicaux libres ; retarder la progression de plusieurs maladies chroniques et éviter le rancissement des aliments par l'oxydation des lipides.

Le but de cette étude préliminaire était d'évaluer la teneur en polyphénols, en flavonoïdes et en tanins ainsi les propriétés antioxydantes de l'extrait aqueux obtenu à partir de la partie aérienne de *Thymus munbyanus*, remède utilisé dans la médecine traditionnelle algérienne.

L'extrait a été obtenu par infusion de la poudre sèche en utilisant l'eau qui a pour but d'extraire les composés fortement polaires et que l'infusion est le mode le plus utilisé en phytothérapie traditionnelle.

L'étude quantitative de l'extrait aqueux de *Thymus munbyanus* au moyen des dosages spectrophotométrique a pour objectif la détermination de la teneur des polyphénols totaux, des

flavonoïdes et des tanins condensés. La raison principale du choix de ces substances réside dans le fait que la majorité des propriétés antioxydantes des plantes leur sont attribués (Yakhlef et al., 2011). Ces composés phytochimiques agissent seuls ou en association en tant qu'agents thérapeutiques pour la prévention et le traitement de plusieurs pathologies (Ozcan et al., 2014) ; Hegazy et al., 2018).

Les résultats du dosage des polyphénols totaux montrent que le contenu phénolique total de l'extrait est de $73.14 \pm 1.30 \mu\text{g}$ d'EAG/mg d'extrait. La teneur en polyphénols de l'extrait est comparable à celle trouvée par Kholkhal et al, (2013) pour la même espèce (64,23 mg EAG/g) et relativement inférieure à celle d'Amamra et al (2018), dans une étude concernant la même espèce $97.11 \pm 2.83\mu\text{g}$ EG/mg.

La teneur de l'extrait en flavonoïdes est de $10.05 \pm 0.29\mu\text{g}$ EQ/mg d'extrait, cela peut être dû à la faible solubilité des flavonoïdes dans l'eau, nécessitant l'extraction d'un solvant organique de la matrice végétale. Le contenu en flavonoïdes de l'extrait est relativement inférieur à celui trouvé par d'autres auteurs pour la même espèce. Kholkhal et al (2013) ont trouvé une teneur en flavonoïdes de l'ordre de 298,2 mg EC/g au niveau de la partie aérienne contre 90,75 mg EC/g dans les racines dans l'extrait méthanolique de *Thymus ciliatus ssp. Coloratus*. Toutefois, cette teneur de l'extrait aqueux en flavonoïde est supérieure à celle trouvée par Amamra et al (2018). Ces derniers l'ont estimé à $07.63 \pm 0.08 \mu\text{g}$ EQ/mg d'extrait. Cette différence pourrait s'expliquer par la nature du solvant ou par la région/ la période ou la plante a été cultivée (Falleh et al., 2008). Pour les tanins condensés, l'extrait aqueux a révélé une teneur de $3.43 \pm 0.21\mu\text{g}$ EC/mg d'extrait, qui est inférieure à celle obtenue par Kholkhal (2013). En effet, la distribution des métabolites secondaires peut varier durant les phases de développement de la plante. Ceci peut être lié aux conditions climatiques extrêmes (température élevée, exposition solaire, sécheresse, salinité...etc.). Ces paramètres stimulent la biosynthèse des métabolites secondaires tels que les tanins (Fallehet al., 2008).

De cette richesse en polyphénols confère à l'extrait une activité antioxydante, car le pouvoir antioxydant d'un extrait est en relation avec ses teneurs en composés phénoliques et particulièrement en flavonoïdes (Oyedeji et al., 2011). De ce fait nous avons procédé à l'évaluation de l'activité antioxydante via trois méthodes (DPPH, la réduction du Fer et le test de décoloration du bêta-carotène).

L'activité antioxydante DPPH de notre extrait indique sa capacité à céder des atomes d'hydrogènes. En outre la comparaison de l'IC₅₀ aux témoins positifs montre que l'extrait aqueux de *Thymus munbyanus* possède une activité antioxydante considérable voire excellente. Ces résultats suggèrent que les extraits de *Thymus munbyanus* renferment des agents piègeurs de radicaux libres agissant comme antioxydants primaires. L'action de ces antioxydants est supposée être due à leur capacité de donation d'atomes d'hydrogène (Le et al., 2007).

La réduction du Fer est une analyse de l'activité antioxydante rapide, reproductible et facile à exécuter. La capacité réductrice d'un composé pourrait servir comme un indicateur significatif de son activité antioxydante potentielle (Dar et al., 2017).

Une étude récente sur le pouvoir réducteur des polyphénols de plantes a montré que le noyau catéchol est la seule structure qui est associée positivement dans le pouvoir réducteur et selon cette étude cette structure augmentera de 36% le pouvoir réducteur d'un composé par rapport à un autre qui n'en contient pas. Ils ont suggéré que cette activité est due à la participation des groupements – OH liés au noyau catéchol (Kholkhal, 2013).

Nous avons remarqué que l'extrait aqueux étudié a une activité antioxydante importante par rapport à l'acide ascorbique et le BHT. Ce pouvoir réducteur peut être expliqué par la présence de réducteurs dans l'extrait de plante, ce qui démontre la propriété de donation d'électrons et par conséquent la capacité à neutraliser les radicaux libres (Le et al., 2007 ; Kumar et al., 2017).

L'évaluation spectrophotométrique des activités antioxydantes par le test de blanchiment du β-carotène, qui est basée sur la perte de la couleur jaune du β-carotène en raison de sa réaction avec des radicaux formés par l'oxydation de l'acide linoléique dans une émulsion. Ce taux de blanchiment du β-carotène pourrait diminuer en présence d'antioxydants (Kulisicet al., 2004). En outre le radical libre joue le rôle d'un médiateur dans le phénomène de blanchiment du β-carotène. En l'absence de l'antioxydant, le β-carotène subit une décoloration rapide qui se traduit par la réduction de l'absorbance de la solution d'essai avec le temps de réaction (Khadri et al., 2008). En effet, l'acide linoléique produit des hydroperoxydes pendant son incubation à 50°C (Kubola et Siviamornpun, 2008). Selon Liyana-Pathirana et al (2006), un extrait qui retarde ou inhibe le blanchissement du β-carotène peut être décrit comme un piègeur de radicaux libres et comme un antioxydant primaire. En outre le test d'inhibition de l'oxydation de l'acide linoléique couplé à celui du β-carotène, paraît très utile comme un modèle mimétique de la peroxydation des lipides dans les membranes biologiques (Ferreria et al., 2006). De ces résultats, il est également apparu

que l'extrait aqueux de *Thymus munbyanus* présente une activité intéressante par rapport aux témoins positifs, l'acide ascorbique et le BHT.

2. Impact du 2,4-D sur les paramètres physiologiques, biochimiques et hématologiques : Effets protecteurs de la supplémentation en extrait aqueux de *Thymus munbyanus* et /ou en sélénium

2.1. Effet du 2,4-D sur l'état général de santé des rats

Nous n'avons enregistré aucun cas de mortalité ni de signes d'intoxication cliniquement décelable aussi bien dans les lots traités par le 2,4-D que dans le groupe témoin et ce tout au long de l'expérimentation.

2.2. Evaluation du poids corporel et du poids des organes

2.2.1. Poids corporel

Tout au long du protocole expérimental, les rats ont été pesés un jour sur deux. Ceci nous a permis de calculer l'évolution du poids corporel dans les différents lots.

Les résultats relatifs aux mesures du poids corporel sont exprimés en moyenne \pm écart-type.

Nos résultats montrent que l'administration du 2,4-D à raison de 5mg/kg de poids corporel ne conduit pas à une modification du poids des animaux après 30 jours de traitement (tableau 5). Le poids corporel a augmenté progressivement tout au long de l'étude dans tous les lots associés à un retard de croissance chez les rats traités par le 2,4-D, bien qu'il n'y ait pas eu de différences significatives entre eux.

2.2.2. Poids absolus et relatif des organes : foie, rein et cerveau

Le poids absolu (PA) et relatif (PR), des organes cibles en l'occurrence le foie, les reins et le cerveau a été estimé chez les rats témoins et traités pendant 30 jour.

Les résultats obtenus montrent que l'administration du 2,4-D à raison de 5mg/kg de poids corporel a augmenté de manière significative ($p < 0.01$) le poids relatif et absolu du foie (+14.20% ; + 33.07% respectivement). On note aussi une variation statistiquement significative ($p < 0.05$) du poids relatif chez les rats recevant la combinaison 2,4-D plus sélénium par rapport au lot témoin. Cependant les analyses statistiques montrent qu'il n'y a pas de variations significatives du poids absolu relatif du foie chez les rats traités uniquement par EQT ou du sélénium comparativement au

lot témoin. Tandis qu'on enregistre une nette amélioration du poids relatif du foie dans les deux lot 2,4-D/EQT et 2,4-D/Se (+ 10.75 % ; 19.92% respectivement).

Concernant le poids relatif des reins, l'analyse des résultats obtenus montre une diminution significative chez le lot traité par le 2,4-D ($p < 0.05$) par rapport au lot témoin. Cependant, les suppléments de EQT et /ou du Se aux rats traités par 2,4-D a restauré le poids relatif des reins à des niveaux équivalant à ceux du témoin (-6.94%, -12.50% respectivement). Ce qui pourrait suspecter l'effet bénéfique de ces deux molécules contre la toxicité induite par le 2,4-D. Tandis que les suppléments en EQT et en sélénium n'ont pas d'effet sur le poids absolu et le poids relatif des reins par rapport au lot témoin (tableau 6).

Le poids absolu et relatif du cerveau a été considérablement réduit (de 10.21, 16.65 % respectivement) chez le lot traité par 2,4-D comparativement aux lot témoin. Cependant, la supplémentation de l'extrait aqueux de *Thymus munbyanus* et/ ou du sélénium aux rats traités par 2,4-D a restauré le poids du cerveau à des niveaux presque à ceux du lot témoin (-10.4 ; - 8.34 respectivement) (tableau 6).

Tableau 6. Variation de poids corporel, poids absolu (g) et relatif (g/100g de PC) du foie, des reins et du cerveau chez les rats témoins et traités après 30 jours du traitement.

Paramètres	Lots expérimentaux					
	Témoin	EQT	Se	2,4-D	2,4-D/EQT	2,4-D/Se
Poids initial (g)	223.33 ± 11.94	221.50 ± 9.46	224.16 ± 9.86	226,66 ± 8.81	225,33 ± 10.75	224.50 ± 9.95
Poids final (g)	278.83 ± 10.29	279.43 ± 13.28	272.33 ± 9.74	257.67 ± 6.70	276.16 ± 10.21	273.83 ± 8.59
Gain de Poids (%)	27.53 ± 3.85	27.58 ± 3.80	21.76 ± 1.79	18.07 ± 1.61	25.48 ± 6.74	23.28 ± 2.75
Poids absolu du foie	07.32 ± 0.25	7.34 ± 0.34 [#]	07.29 ± 0.20 [#]	08.36 ± 0.22 [*]	07.68 ± 0.31	07.95 ± 0.12
%	-----	+ 0.27	-0.41	+14.20	+ 4.90	+ 8.61
Poids relatif du foie	02.51 ± 0.05	02.59 ± 0.11 [#]	02.68 ± 0.09 [#]	03.34 ± 0.12 ^{**}	02.78 ± 0.14	03.01 ± 0.08 [*]
%	-----	+ 3.19	+ 6.77	+ 33.07	+ 10.75	+19.92
Poids absolu des reins	1.95 ± 0.08	1.97± 0.10	2.03±0.09	1.51 ± 0.05 [*]	1.83 ± 0.07	1.72 ± 0.07
%	-----	+1.03	+ 4.10	-22.56	-6.17	-11.79
Poids relatif des reins	0.72 ± 0.03	0.74 [#] ± 0.04	0.75 ± 0.05	0.57 ± 0,019 [*]	0.67 ± 0.025	0.63 ± 0.17
%	-----	+1.39	+ 4.17	-20.83	-6.94	-12.50
Poids absolu du cerveau	1.27 ± 0.06	1.32 ± 0.09	1.23±0.05	1.08 ± 0.04	1.19 ±0.08	1.21 ± 0.03
%	-----	+ 3.94	-3.14	-14.96	- 6.29	-4.72
Poids relatif du cerveau	0.48 ± 0.024	0.49 ± 0.032	0.45 ± 0.018	0.40 ± 0,025	0.43 ± 0.03	0.44 ± 0.010
%	-----	+2.08	-6.25	-16.65	-10.41	-8.34

Les valeurs sont exprimées sous forme de moyenne ± SEM (n = 6 animaux)

**P <0,01 ; *P<0,05 : Différence significative vs témoin

##P <0,01 ; #P < 0,05 : Différence significative vs traité par le 2,4-D

Discussion

Le Désormone lourd D à base de 2,4-D est un herbicide sélectif largement utilisé dans l'agriculture en Algérie. Sa sélectivité envers les dicotylédones l'inscrit dans les herbicides les plus employés pour lutter contre les adventices des cultures céréalière (blé tendre, blé dur, orge et avoine) et des plantes vivaces de la famille des monocotylédones. Il est même utilisé en hygiène publique pour l'entretien des pelouses (Peterson *et al.*, 2016).

La toxicité du 2,4-D a fait l'objet de plusieurs études expérimentales. Ces études ont montré que le 2,4-D inhibe le système enzymatique antioxydant de façon dose-dépendante et de ce fait favorise l'apparition des dommages aux niveaux du foie et des reins (Shafeeq et Mahboob, 2019) et du cerveau (Nakbi *et al.*, 2016).

La présente étude a pu mettre l'accent pour la première fois sur l'effet protecteur des suppléments en extrait aqueux de *Thymus munbyanus* à une dose de 10 ml /kg de poids corporel et du sélénium à raison de 0.2mg /kg de poids corporel vis-à-vis de la toxicité induite par le 2,4-D à une dose de 5mg/ kg chez les rats Wistar.

Il a été rapporté dans un ensemble de travaux que la réduction du poids corporel serait un indicateur approuvable de la détérioration de l'état de santé général des animaux. En outre, la perte d'appétit est souvent synonyme de perturbations du métabolisme des glucides, des protéines et/ou des lipides (Yuet *et al.*, 2013). Dans nos conditions expérimentales, l'administration du 2,4-D à raison de 5mg /kg de poids corporel chez rats a provoqué une diminution de 7.60 % du gain de poids corporel par rapport au lot témoin. Ceci pourrait être expliqué par une diminution des prises quotidiennes en aliment (données non documentées) (Tayeb *et al.*, 2010).

Dans les études de toxicologie, l'estimation du poids des organes est un bon indicateur dans l'évaluation des effets nocifs des xénobiotiques (Bailey *et al.*, 2004, Sellers *et al.*,2007). La présente étude révèle une augmentation significative du poids relatif et absolu du foie. Cette hypertrophie pourrait s'expliquer par une hyper sollicitation des mécanismes de détoxification en réponse à l'effet toxique de l'herbicide. Dans ce sens, Maronpot *et al.* (2010) ; Hall *et al.* (2012) et Sharma *et al* (2014) ont rapporté que l'ingestion des pesticides chez les rats est accompagnée par une augmentation à la fois du métabolisme hépatique et de l'excrétion rénale, qui se traduit par une augmentation de la masse relative du foie de l'animal. De plus, nos résultats sont en accord avec ceux de Nakbi *et al.* (2010) qui montrent que l'administration du 2,4-D à raison de 5mg/kg de poids corporel pendant 4 semaines chez le rat a augmenté significativement le poids du foie. De même,

Tayeb *et al.* (2010) ont montré que l'administration du 2,4-D à des doses de 15, 75 et 150 mg/kg pendant 28 jours chez des rats males a provoqué une augmentation significativement du poids relatif et absolu du foie. Ces variations pondérales vont de paire avec les altérations tissulaires du foie.

L'administration du 2,4-D a provoqué une diminution du poids des reins. Cette atrophie peut être expliquée par la réduction de la longueur des tubules proximaux et distaux. Ce qui se traduit par une diminution du volume glomérulaire qui est associé à une réduction de la synthèse des protéines et à une diminution de l'apport alimentaire (Tayeb *et al.*, 2012 ; Upadhyaya *et al.*, 2018).

Dans notre étude expérimentale le traitement des rats par le 2.4-D à raison de 5 mg /kg pendant 30 jours a provoqué une diminution significative du poids du cerveau. En effet l'exposition au 2.4-D a été associée à divers effets neurologiques et comportementaux (Madrigal-Bujaidar *et al.*, 2001 ; Bongiovanni *et al.*, 2011) comme la diminution du poids relatif et absolu du cerveau et une altération du dépôt de la myéline cérébrale (Brusco *et al.*, 1997 ; Nakbi *et al.*, 2016).

En revanche l'administration de l'extrait aqueux chez les rats traités par le 2.4-D a rétabli le poids corporel et les poids relatifs des organes (foie, reins et cerveau). Ceci pourrait être dû au rétablissement de l'activité alimentaire des rats suite à la réduction de l'accumulation des radicaux libres et à l'atténuation de l'effet toxique du 2.4-D au niveau cérébral. De tels effets traduisent la capacité antioxydante de EQT, qui est généralement attribuée à sa richesse en composés phénoliques polyphénols, flavonoïdes et tanins, qui agissent seuls ou en association en tant qu'agents protecteur dans cette étude (Kholkhal *et al.*, 2013, Hegazy *et al.*, 2018).

La supplémentation en sélénium aux rats traités par le 2.4-D a induit une amélioration du poids absolu et relatif des organes (foie, reins et cerveau). Cette amélioration peut être expliquée par l'effet protecteur du sélénium prouvé déjà par plusieurs études, contre un large éventail de xénobiotiques (Mansour *et al.*, 2017 ; Marija *et al.*, 2017 ; Ben-Saad *et al.*, 2017).

2.3. Etude des paramètres biochimiques

Les résultats observés après le dosage sérique des paramètres biochimiques sont illustrés dans les tableaux 7.8.9. Ces résultats affirment l'existence d'une grande perturbation métabolique

2.3.1. Effet du traitement sur les réponses des marqueurs biochimiques de la fonction hépatique

- **Protéines totales et l'albumine**

Les résultats de la présente étude révèlent que l'administration du 2,4-D à 5 mg/kg de poids corporel chez les rats provoque une diminution significative ($P < 0,05$) de la teneur plasmatique en protéines totales (-24.63 %) et en albumine (-17.26 %). Tandis que chez les rats traités uniquement par l'extrait aqueux de *Thymus munbyanus* ou par le sélénium et par combinaison : 2,4-D/EQT ou combinaison 2,4-D/Se, on n'enregistre aucune différence significative comparativement aux rats témoins (tableau 7).

- **Transaminases, phosphatase alcaline et la bilirubine**

Les paramètres enzymatiques associés au métabolisme hépatique qui ont été mesurés chez les rats témoins et traités sont illustrés dans le tableau 7. Nos résultats montrent que l'administration du 2,4-D chez les rats a provoqué une augmentation hautement significative d'ASAT, PAL et le bilirubine ($p < 0.01$) accompagnée d'une augmentation significative d'ALAT ($p < 0.05$) comparativement aux témoins. Cependant, la supplémentation de l'extrait aqueux de *Thymus munbyanus* aux rats traités par le 2,4-D a restauré les niveaux des transaminases et de phosphatase alcaline presque à celui des témoins. Tandis que la combinaison 2,4-D/Se a montré une stabilité relative de ces paramètres (ASAT, PAL et LDH ; ($p < 0.05$)).

- **Lactate Déshydrogénase (LDH) et gamma-glutamyl- transférase (γ -GT)**

L'administration du 2,4-D chez les rats a provoqué une augmentation hautement significative de LDH ($p < 0.01$) et une augmentation significative de γ -GT ($p < 0.05$). Par contre, on note un rétablissement par une diminution significative de LDH chez les rats traités par les combinaisons 2,4-D plus extrait aqueux et/ou sélénium accompagnée d'une amélioration remarquable de la concentration de γ -GT par rapport aux rats recevant le 2,4-D seulement (tableau 7).

2.3.2. Effet du traitement sur le métabolisme glucidique et lipidique

L'influence de l'administration *per os* du 2,4-D pendant 30 jours sur la variation des concentrations du glucose, du cholestérol et des triglycérides sont reportées dans le tableau 8.

Les résultats n'ont montré aucun changement statistiquement significatif dans les concentrations plasmatiques du cholestérol et du glucose chez tous les lots expérimentaux. Seul le taux de triglycéride a diminué (-17.80) après 30 jours de traitement chez le lot recevant le 2,4-D ($p < 0,05$).

2.3. 3. Effet du traitement sur les réponses des marqueurs biochimiques de la fonction rénale

Les paramètres plasmiques associés à la fonction rénale mesurés chez les rats témoins et traités à savoir l'urée, l'acide urique et la créatinine sont rapportés dans le tableau 9.

Nos résultats mettent en évidence une augmentation hautement significative ($P < 0.01$) de la concentration plasmique en créatinine (+41.38%) accompagnée d'une diminution remarquable ($P < 0,05$) en acide urique (-32.90%) chez les rats traités par le 2,4-D. En revanche la co-administration de l'extrait aqueux aux rats recevant le 2,4-D semble atténuer ces différences (créatinine +15.51% ; l'acide urique -10.33). Aucune différence significative chez les rats traités par l'extrait aqueux par rapport au lot témoin. Cependant, on note une augmentation significative ($P < 0,05$) de la créatinine (+24.13%) et une amélioration de la concentration plasmique en acide urique (-8.93%) chez les rats traités par la combinaison 2,4-D/Se. Aucune différence significative n'est notée chez les rats traités par le sélénium par rapport au lot témoin.

2.4. Effet du traitement sur les paramètres hématologiques

Les résultats des analyses hématologiques suite à l'analyse de la formule de numération sanguine FNS sont représentés dans le tableau 10. Nos résultats révèlent que le traitement par le 2,4-D provoque une diminution significative ($P < 0,05$), de l'hémoglobine (- 14.87%), d'hématocrite (- 11.43 %) et des globules rouges (17.73 %). Toutou fois un effet inflammatoires a été constaté l'augmentation des lymphocytes (+19.60%) par rapport au lot témoin.

Par ailleurs, les supplémentations en extrait aqueux et /ou en sélénium montre une stabilité relative de ces paramètres. Ce qui montre l'effet bénéfique de ces deux molécules.

Tableau 7. Les biomarqueurs plasmatiques de la fonction hépatique chez les rats témoins et traités après 30 jours du traitement.

Paramètres	Lots expérimentaux					
	Témoin	EQT	Se	2,4-D	2,4-D/EQT	2,4-D/Se
Protéine totale (g/L)	69.24 ± 5.48	76.03 ± 4.56 [#]	72.39 ± 4.6 [#]	52.18 ± 2.85 [*]	63.01 ± 3.42	58.17 ± 7.55
%	-----	+9.80	+4.55	-24.63	-9.00	-15.98
Albumine (g/L)	47.16 ± 1.89	47.92 ± 1.44 [#]	45.72 ± 2.56 [#]	39.02 ± 2.84 [*]	43.15 ± 4.17	42.05 ± 3.19
%	-----	+1.61	-3.05	-17.26	-8.50	-10.83
γ-GT (IU/L)	03.72 ± 0.49	3.87 ± 0.42	03.94 ± 1.02	05.84 ± 0.33 [*]	04.83 ± 0.62	05.51 ± 0.84
%	-----	+ 4.03	+5.91	+56.98	+29.83	+ 48.11
TB (mg/L)	01.87 ± 0.20	1.89 ± 0.13 ^{##}	01.94 ± 0.26 ^{##}	03.72 ± 0.18 ^{**}	2.21 ± 0.15 [#]	02.63 ± 0.35 [*]
%	-----	+1.06	+3.74	+ 94.03	+ 18.20	+ 40.64
ASAT (IU/L)	140.17 ± 11.60	145.02 ± 11.24 ^{##}	151 ± 8.01 [#]	223.07 ^{**} ± 9.43	165.68 ± 8.56 [#]	195.90 ± 7.63 [*]
%	-----	+ 3.46	+7.72	+ 59.14	+18.19	+39.75
ALAT (IU/L)	54.65 ± 7.52	57.03 ± 5.8 [#]	58.24 ± 7.34 [#]	90.01 ± 11.50 [*]	66.08 ± 4.51	77.53 ± 4.02
%	-----	+4.85	+6.57	+ 64.70	+ 20.91	+ 41.86
PAL (IU/L)	127.68 ± 10.61	125.33 ± 11.07 ^{##}	135.50 ± 14.45 ^{##}	185.28 ± 8.30 ^{**}	145.10 ± 7.65 [#]	163.11 ± 9.25 [*]
%	-----	-2.09	+6.12	+45.11	+13.64	+27.75
LDH (IU/L)	654.57 ± 50.94	662.17 ± 43.6 ^{##}	611.66 ± 76.57 ^{##}	1439.83 ± 145.77 ^{**}	1186.5 ± 110.84 [*]	990.16 ± 119.31 ^{*#}
%	-----	+1.16	-6.55	+ 119.96	+ 81.26	+51.26

Les valeurs sont exprimées sous forme de moyenne ± SEM (n = 6 animaux) ;

(*P<0.05, **P< 0.01) comparativement aux rats témoins ;

(#P<0.05, ##P<0.01) comparativement aux rats traités par le 2,4-D ;

Tableau 8. Effet du traitement sur le métabolisme glucidique et lipidique chez les rats témoins et traités après 30 jours du traitement.

Paramètres	Lots expérimentaux					
	Témoin	EQT	Se	2,4-D	2,4-D/EQT	2,4-D/Se
Cholestérol (g/l)	0.75 ± 0.07	0.72 ± 0.04	0.71 ± 0.03	0.87 ± 0.10	0.81 ± 0.14	0.77±0.06
%	-----	-4.00	-5.33	+16	+8.00	+2.66
Triglycéride (g/l)	0.73 ± 0.08	0.76 ± 0.06 [#]	0.73 [#] ± 0.09	0.60* ± 0.02	0.69 ± 0.04	0.65 ± 0.03
%	-----	+4.11	+00	-17.80	-5.48	-10.95
Glycémie	0.98±0.023	1.03±0.12	0.93±0.06	1.30±0.24	1.04±0.11	1.14±0.15
%	-----	+5.10	-4.08	+ 32.65	+6.12	+16.32

Les valeurs sont exprimées sous forme de moyenne ± SEM (n= 6 animaux) ;

*P<0.0 : Comparativement aux rats témoins ;

[#]P<0.05 : Comparativement aux rats traités par le 2,4-D ;

Tableau 9. Variation des paramètres biochimiques de la fonction rénale chez rats témoins, traités par EQT, Se, 2,4-D et les combinaisons : 2,4-D / EQT et 2,4-D/ Se après 30 jours de traitement.

Paramètres	Lots expérimentaux					
	Témoin	EQT	Se	2,4-D	2,4-D/EQT	2,4-D/Se
Urée (mg/dl)	36.42 ± 1.7	35.89 ± 2.60	38.25 ± 1.9	43.07 ± 3.15	39.18 ± 2.64	41.02 ± 3.6
%	-----	-1.45	+ 5.02	+18.25	+7.58	+12.36
Créatinine (mg/dl)	0.58 ± 0.03	0.53 ± 0.028 ^{##}	0.56 ± 0.022 [#]	0.82 ± 0.04 ^{**}	0.67 ± 0.03 ^{*#}	0.74 ± 0.035 [*]
%	-----	-8.62	-3.44	+ 41.38	+15.51	+24.13
Acide urique(mg/dl)	7.84 ± 0.38	8.04±0.29 [#]	8.12 ± 0.40 [#]	5.26± 0.24 [*]	7.03 ± 0.35	7.14 ± 0.4
%	-----	+ 2.55	+ 3.57	-32.90	-10.33	-8.93

Les valeurs sont exprimées sous forme de moyenne ± SEM (n = 6 animaux) ;

(*P<0.05, **P< 0.01) comparativement aux rats témoins ;

([#]P<0.05, ^{##}P<0.01) comparativement aux rats traités par le 2,4-D ;

Tableau 10. Profil hématologique chez les rats témoins et les traités après 30 jours de traitement.

Paramètres	Lots expérimentaux				2,4-D/ EQT	2,4-D/Se
	Témoin	EQT	Se	2,4-D		
GB (10 ³ /μl)	7.01 ± 0,52	7.18 ± 0,70	6.78 ± 0,44	8.1 ± 1.27	7.85 ± 0,61	8.23 ± 0,95
%	-----	+2.43	-6.71	+6.48	+ 12.01	+17.40
GR(x10 ³ /μl)	7.22 ± 1.03	7.25 ± 0.73 [#]	7.14 ± 1.29 [#]	5.94 ± 0.65 [*]	6.74 ± 0.92	6.51 ± 0.68
HGB (g/dl)	16,34 ± 01.48	16.59 ± 0,34 [#]	15.84 ± 0.65 [#]	14.86± 0,60 [*]	15.36 ± 0,39	15,08 ± 0,29
%	-----	+1.52	-3.60	-14.87	-6.01	-7.72
HCT (%)	37.43 ± 2.05	37.95 ± 2.34 [#]	38.29 ± 1.24 [#]	33.15 ± 1.36 [*]	35.91 ± 1.89	35.40 ± 1.11
%	-----	+1.40	+2.30	-11.43	-4.06	-5.42
VGM (fl)	46.31 ± 2.33	45.01 ± 0.40	44,36 ± 0.82	43.07 ± 1.03	44.81± 0.31	43.84 ± 0.64
%	-----	-2.80	-4.21	-7.06	- 3.24	- 5.33
TGMH (g/dl)	38.21 ± 0.91	38,24 ± 0.56	38.81 ± 0.45	40.06 ± 0.84	39.38 ± 0.73	39.84 ± 0.73
%	-----	+ 0.079	+ 1.57	+ 4.84	+ 3.06	+ 4.26
TMCH (pg)	17.54± 0.39	17.82 ± 0.34	17.10 ± 0.22	16.57±0.24	17.65±0.41	17.72 ± 0.38
%	-----	+1.60	-2.51	-5.53	+ 0.62	+1.02
LY (%)	53.14 ± 5.40	51.08 ± 2.10 [#]	54,33 2.38 [#]	63.25 ± 3.42 [*]	56.71 ± 2.84	58.01 ± 2.28
%	-----	-3.87	+2.53	+19.60	+5.70	+9.60%
MO (%)	12.96 ± 1.10	12.22 ± 1.84	12.42 ± 1,32	11.46 ± 0.55	11.56 ± 1.44	11.87 ± 0.93
%	-----	-5.70	-4.08	-1157	-10.80	-8.41

Les valeurs sont exprimées sous forme de moyenne ± SEM (n = 6 animaux) ; *P < 0,05 : Différence significative comparant au lot témoin ;

[#]P < 0,05 : Différence significative comparativement au lot traité par le 2,4-D ;

Discussion

Plusieurs études *in vitro* et *in vivo* démontrent que l'exposition au 2,4-D peut provoquer un certain nombre d'effets néfastes, y compris un dysfonctionnement hépatique, hématologique (Tayeb *et al.*, 2013 ; Deshmukh et Ramteke, 2017) et rénal (Shafeeq et Mahboob, 2019).

Le foie, principal organe de métabolisme, d'excrétion intervenant dans la détoxification des xénobiotiques (Rjeibi *et al.*, 2016), doté d'un accès immédiat aux substances toxiques provenant du tube digestif à travers la veine porte, exerce une action chimique et enzymatique sur ces agents (LeCluyse *et al.*, 2012). Lors d'insuffisance hépatique, ces substances indésirables ont tendance à s'accumuler dans le corps et entraînent potentiellement des toxicités.

La présente étude montre que les variations pondérales observées suite au traitement par 2,4-D vont de pair avec les altérations tissulaires du foie. En effet, il est à noter une dilatation des espaces sinusoïdaux, une congestion de la veine centro-lobulaire ainsi qu'un phénomène de nécrose cellulaire chez les rats recevant le 2,4-D. Nos résultats sont en accord avec ceux de Nakbi *et al.*, (2012) qui ont montré que l'exposition au 2,4-D à raison de 5 mg / kg de poids corporel pendant 4 semaines génère des dommages de la vascularisation et favorise la nécrose via la stimulation des facteurs apoptotiques au niveau des hépatocytes. De même Mountassif *et al.* (2008) ; Deshmukh et Ramteke (2017) ont noté de sévères altérations de l'architecture du foie accompagnée d'une nécrose cellulaire. Ces changements au niveau des paramètres biométriques et histopathologiques s'accompagnent souvent d'un dysfonctionnement des réponses des marqueurs enzymatiques hépatique inhérente de la toxicité de l'herbicide. En effet, l'administration du 2,4-D à raison de 5 mg/kg de poids corporel, pendant 4 semaines chez les rats a entraîné une sollicitation des transaminases (AST, ALT), γ -GT, PAL, LDH et de la bilirubine, avec une diminution des niveaux des protéines totales et notamment de l'albumine. Ces changements biochimiques mettent en avant un effet cytolytique induit par le 2,4-D. Dans ce sens Celik *et al.* (2006) et Tayeb *et al.* (2010) ont mis en évidence que cet herbicide pourrait altérer la perméabilité membranaire et provoquer une fuite des enzymes vers le plasma. En outre, (Shafeeq et Mahboob (2019).

Les reins sont des organes vitaux qui remplissent leurs fonctions via l'élimination des déchets métaboliques azotés, le maintien de l'homéostasie et la synthèse des hormones essentielles (Millet-Boureima., 2018). Les reins sont très sensibles aux substances toxiques pour deux raisons ; Un grand volume de sang y circule pour filtrer de grandes quantités de toxines (Oduola *et al.*, 2010).

Les reins sont parmi les principaux organes cibles suite à l'exposition au 2,4-D, qui s'accumule dans le tissu rénal (Aydin et al., 2005). Cette susceptibilité des reins à la toxicité, provoque des effets toxiques impliquant le néphron et plus précisément, les cellules tubulaires et glomérulaires (Uyanikgil et al., 2009, Troudi et al., 2011).

Dans la présente étude, l'administration du 2,4-D à raison de 5 mg/kg de poids corporel, pendant 30 jours chez les rats a entraîné des perturbations au niveau des marqueurs biochimiques de la fonction rénale, se traduisant par une augmentation significative des taux plasmatiques en créatinine et une diminution de l'acide urique. Ces deux marqueurs témoignent en faveur d'une atteinte de la fonction rénale (Tayeb et al., 2012). En effet, l'augmentation du taux sérique de la créatinine provoquée par le 2,4-D peut être expliquée par la réduction du taux de filtration glomérulaire et/ou par une rétention de la créatinine dans le sérum.

L'acide urique, issu du catabolisme des purines est capable de réduire le stress oxydatif en piégeant diverses espèces réactives de l'oxygène (Regoli et Winston, 1999). Il représente 60 % de la capacité antioxydante plasmatique (Letonturier, 2002). Dans la présente étude la diminution du taux de l'acide urique sérique, pourrait être expliqué par une réponse adaptative à la production endogène accrue des EROs, puisque l'acide urique est un piègeur puissant de radicaux OH[•], ROO[•], NOO[•] ... (Haleng et al., 2007). Ceci est appuyé par une diminution des protéines totales et de la concentration d'albumine dans le plasma (Nakbi et al., 2012), Ces résultats sont en accord avec d'autres études ou des dommages de la fonction rénale ont été signalé chez les rats suite à une exposition au 2,4-D (Deshmukh et al., 2017, Upadhyaya et al., 2018), qui peut être due à une lésion des néphrons, des tubules rénaux et à la diminution de la filtration glomérulaire.

Les résultats relatifs au bilan lipidique montrent une diminution du taux des triglycérides chez le lot traité par le 2,4-D par rapport au lot témoin. La diminution du taux des triglycérides observé, peut être un indicateur potentiel de l'altération du métabolisme des acides gras et de la peroxydation des lipides membranaires (Ismail, 2013). Nos résultats sont en accord avec les travaux de Nakbi et al (2012), qui montrent que l'administration du 2,4-D à raison de 5 mg/Kg chez les rats a provoqué une diminution significative du taux des triglycérides. De même, les résultats de Mountassif et al (2008), qui ont rapporté que le traitement quotidien de la gerboise (*Jaculus orientalis*) par le 2,4-D induit une toxicité qui affecte le métabolisme énergétique, marqué par une diminution significative du taux des triglycérides.

Le système hématopoïétique est l'une des cibles préférées des radicaux libres inhérents à l'accumulation des produits chimiques (Mukinda, 2007). Dans notre étude, les paramètres hématologiques ont également été évalués pour obtenir d'autres informations liées à la toxicité du 2,4-D. En effet Les principaux tests hématologiques recommandés dans les études toxicologiques comprennent le nombre total de globules blancs(GB), le nombre total des globules rouges(GR), le nombre de plaquettes, l'hématocrite(HCT), le volume globulaire moyen (VGM), la concentration moyenne corpusculaire en hémoglobine (CCMH) et la teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine (TCMH) (Suckow et al., 2012).

Nos résultats révèlent une diminution de la teneur en hémoglobine, hématocrite et le taux des globules rouges chez les rats traités par le 2,4-D.

La diminution de la concentration en Hb et du nombre des globules rouges observées dans notre étude peut être due à l'effet du pesticide sur les tissus érythropoïétiques, ou principalement sur la biosynthèse de l'érythropoïétine hépatique ou rénale, hormone indispensable dans le processus d'hématopoïèse. En effet, l'exposition aux pesticides induit une anémie résultant de la réduction de la biosynthèse de l'Hb et de la diminution de la durée de vie des érythrocytes dans la circulation. En outre, la réduction de synthèse d'hémoglobine (Hb) pourrait être responsable d'une diminution du nombre d'érythrocytes, entraînant une baisse des valeurs d'hématocrites (Yassa et al.,2011 ; Mehra et al., 2014). Des modifications similaires de la valeur des : hématocrites, hémoglobine et des globules rouges ont été rapportées par Kadeche et al, (2017), chez des rats après une exposition au métribuzine.

Dans notre travail, l'administration du sélénium à raison de 0.2 mg/kg semble avoir un effet réparateur voire protecteur contre la toxicité du 2,4-D au niveau hépatique et rénal. Ceci est révélé par un rétablissement des concentrations des marqueurs enzymatiques sériques, les transaminases (ALAT, ASAT), PAL, LDH d'une part et par la restauration des niveaux des protéines, de l'albumine et de l'architecture tissulaire du foie d'autre part. En outre la supplémentation en sélénium a restauré les taux sériques en créatinine et en acide urique, ceci peut être expliqué par ses propriétés antioxydantes qui lui confèrent un rôle majeur dans la détoxification des xénobiotiques. Cet effet prophylactique du sélénium a été aussi rapporté par Ben amara et al, (2011) et par Mansour et al, (2017) vis-à-vis à la toxicité du diméthoate et de la deltaméthrine respectivement. La supplémentation en sélénium pourrait moduler l'expression de certaines sélénoprotéine telles que la glutathion peroxydase 1, la méthionine-R-sulfoxyde réductase 1

(MsrB1), la sélénoprotéine S et la sélénoprotéine P, ce qui aboutit indirectement à la diminution des EROs intracellulaires (Zhou et al., 2013 ; Taeho et al., 2016).

Dans la présente étude l'administration de l'extrait aqueux aux rats a atténué l'hépatotoxicité induit par le 2,4-D, comme il est montré par les profils d'activité d'ASAT, ALAT, PAL et des niveaux des protéines totales et d'albumine avec des valeurs semblables à celles des rats témoins et il a restauré les taux sériques en urée, créatinine et en acide urique. Ces résultats indiquent clairement que l'extrait aqueux du *Thymus munbyanus* exerce un effet protecteur sur les lésions hépatiques et rénales induites par le 2,4-D, ceci pourrait être due aux propriétés antioxydantes qui ont été prouvé *in vitro* (Kholkhal et al., 2013. ; Bendif et al., 2017 ; Sadou et al., 2016) et de plus par sa richesse en flavonoïdes possédants des effets protecteurs sur les cellules du foie en préservant l'intégrité de la membrane cellulaire et en réduisant les fuites d'enzymes grâce au piégeage des radicaux libres (Sofiane et al ., 2015 ;Ahmadi et al., 2019). En effet, certain nombre d'extraits de produits naturels et d'antioxydants alimentaires ont montré des effets protecteurs contre la néphrotoxicité. Dans l'ensemble, les résultats suggèrent que les propriétés antioxydantes de ces composés contribuent de manière significative à un effet néphroprotecteur (Rajagopal et al., 2013). Nos résultats relatifs aux profils des paramètres biochimiques sont concomitants avec les résultats histologiques qui ont montré que l'extrait aqueux a un potentiel cytoprotecteur vis-à-vis de la toxicité du 2,4-D.

L'extrait aqueux de *Thymus* a restauré les indices hématologiques à des valeurs assez proches du lot témoin. Ce rôle phyto-thérapeutique peut être attribué à ses constituants phytochimiques déterminant ainsi sa capacité à réparer les cellules souches endommagées. En rapport avec nos résultats, sur les effets protecteurs d'autres extraits de plantes contre l'hémato-toxicité provoquée par les pesticides, l'étude réalisée par Elzoghby et al (2014) a démontré l'effet protecteur du thé vert contre l'altération des paramètres hématologiques induits par le malathion. Dutta et al (2014), également ont rapporté des effets bénéfiques et sanitaires de l'extrait de graines de *Pterocarpus santalinus*.

3. Stress oxydatif induit par le 2,4-D : Effets protecteurs de la supplémentation en extrait aqueux de *Thymus munbyanus* et/ou en sélénium

3.1. Effet du traitement sur les paramètres non-enzymatiques

3.1.1. Taux du glutathion réduit (GSH)

Le traitement des rats par le 2,4-D à une dose de 5mg/kg de poids corporel pendant 30 jours, a provoqué une diminution significative ($p < 0.01$) de la teneur cellulaire en glutathion dans le foie (- 31.55 %), les reins (- 30.20%) et une diminution significative ($P < 0,05$) de la teneur en GSH cérébrale (-20.68%) comparativement au lot témoin. Tandis que les rats traités par l'extrait aqueux et à la combinaison (2,4-D/ EQT) ne montrent aucune variation significative du glutathion réduit. Par ailleurs la supplémentation en sélénium semble atténuer l'effet oxydatif du 2,4-D traduisant par une augmentation du contenu en glutathion réduit hépatique et cérébral. Tandis qu'une diminution significative ($P < 0,05$) du taux du glutathion rénal (-18.75%) a été enregistrée chez les animaux traités par le (2,4-D/Sélénium), comparativement au lot témoin, et aucune variation significative du taux de GSH dans les organes étudiés chez le lot traité uniquement par le sélénium (tableau 11).

3.1.2. Peroxydation lipidique

La déplétion de la défense antioxydante hépatique, rénale et cérébrale a été associée par une peroxydation lipidique importante, révélée par une augmentation hautement significative ($P < 0.01$) du taux MDA dans le foie (+ 46.07%), dans les reins (+ 40.38 %), accompagnée d'une augmentation significative de MDA cérébrale ($P < 0.05$) et aucune variation significative du taux de MDA dans les organes étudiés chez les lots traités uniquement par l'extrait aqueux et/ ou en sélénium (tableau 11).

En revanche, la co-administration de l'extrait aqueux avec le 2,4-D réduit significativement l'augmentation de taux de MDA dans les organes étudiés (foie et rein), avec un rétablissement de MDA cérébrale (Tableau 11). Toutefois la supplémentation en sélénium semble atténuer l'effet oxydatif du 2,4-D traduisant par une diminution remarquable de la peroxydation lipidique dans le foie (-17%), dans les reins (-21.15%) et dans le cerveau (- 6.57 %).

3.1.3. Taux de protéines carbonylées

Concernant l'effet oxydant du 2,4-D sur la fraction protéique hépatique, rénale et cérébrale. Nos résultats montrent une augmentation hautement significative ($P < 0.01$), de protéines carbonylées (54.63%), dans le foie et significative ($P < 0,05$) dans les reins (23.27 %) par rapport au lot témoin. En revanche, on note un rétablissement par une diminution de la teneur en protéines carbonylées chez les rats traités par les combinaisons 2,4-D plus extrait aqueux et /ou en sélénium par rapport aux rats traités par le 2,4-D avec des pourcentages de réduction de l'ordre de (-28.33 %) dans le foie et (-12.44 %) dans les reins chez les rats traités par la combinaison EQT/2,4-D est de l'ordre de $-(22.25\%), (-7.29\%)$ pour la combinaison 2,4-D/Sélénium dans le foie et les reins respectivement (tableau 11).

Tableau 11. Variation du glutathion, de MDA et de PCO dans les organes (foie, rein et cerveau) chez les rats témoins et traités ; par EQT, Se, 2,4-D et aux combinaisons (2,4-D/EQT) ; (2,4-D/Se) après 30 jours de traitement.

Paramètres	Les organes	Lots expérimentaux					
		Témoin	EQT	Se	2,4-D	2,4-D/ EQT	2,4-D/Se
GSH ($\mu\text{mol}/\text{mg prot.}$)	Foie	01.68 \pm 0.13	01.74 \pm 0.10	01.60 \pm 0.08 ^{##}	01.15 \pm 0.05 ^{**}	1.45 \pm 0.14	01.26 \pm 0.07
	%	-----	+ 3.57 %	- 5.23 %	- 31.55 %	-13.69 %	- 25 %
	Rein	0.96 \pm 0.05	1.03 \pm 0.07 ^{##}	0.94 \pm 0.08 ^{##}	0.67 \pm 0.03 ^{**}	0.87 \pm 0.09 [#]	0.76 [*] \pm 0.034
	%	-----	+ 9.38	-2.8	-30.20	-9.37	-18.75
	Cerveau	0.29 \pm 0.02	0.32 \pm 0.05 [#]	0.31 \pm 0.04 ^{##}	0.23 \pm 0.013 [*]	0.26 \pm 0.036	0.28 \pm 0.015
	%	-----	+10.34	+6.89	-20.68	-10.34	-3.44
MDA ($\text{nm}/\text{mg prot.}$)	Foie	01.02 \pm 0.07	0.94 \pm 0.05 ^{##}	0.97 \pm 0.10 ^{##}	1.49 \pm 0.08 ^{**}	1.14 \pm 0.04	1.32 \pm 0.05 [*]
	%	-----	-7.84	-4.90	+ 46.07	+ 11.76	+ 29.41
	Rein	0.52 \pm 0.04	0.47 \pm 0.03 ^{##}	0.46 \pm 0.034	0.73 \pm 0.05 ^{**}	0.58 \pm 0.06 [#]	0.62 \pm 0.09
	%	-----	-9.61	-9.52	+ 40.38	+11.53	+19.23
	Cerveau	0.10 \pm 0.009	0.098 [#] \pm 0.011	0.096 \pm 0.012	0.16 \pm 0.013 [*]	0.12 \pm 0.03	0.11 \pm 0.01
CPO ($\mu\text{mol}/\text{mg prot.}$)	Foie	26.90 \pm 1.50	27.06 \pm 1.56 ^{##}	25.39 \pm 3.43 ^{##}	41.60 \pm 1.97 ^{**}	33.95 \pm 1.68 ^{*#}	35.61 \pm 2.73 [*]
	%	-----	+ 0.60	-5.61	54.63	+26.20	+ 32.38
	Rein	5.63 \pm 0.30	5.61 \pm 0.40 [#]	5.66 \pm 0.43 [#]	6.94 \pm 0.46 [*]	6.50 \pm 0.37	6.54 \pm 0.38
	%	-----	-0.35	+ 0.53	+23.27	+10.83	+15.98

Les valeurs sont exprimées sous forme de moyenne \pm SEM (n = 6 animaux) ;

(*P<0.05, **P< 0.01) comparativement aux rats témoins ;

(#P<0.05, ##P<0.01) comparativement aux rats traités par le 2,4-D ;

3.2. Effet du traitement sur les paramètres enzymatiques

3.2.1. Activité enzymatique de la superoxyde dismutase

Nos résultats montrent que le traitement par le 2,4-D à raison de 5 mg/kg de poids corporel pendant 30 jours a provoqué une diminution hautement significative ($p < 0.01$) de l'activité enzymatique de la SOD hépatique (-33.26 %) et une diminution significative ($p < 0.05$) de la SOD au niveau des reins (-31.45%), comparativement au lot témoin. Tandis qu'on enregistre un rétablissement par une augmentation non significative de la SOD hépatique et rénale chez le lot traité par la combinaison 2,4-D/EQT, et de l'activité SOD rénale chez le lot traité par le 2,4-D plus sélénium comparativement au lot traité uniquement par 2,4-D. Cependant une diminution significative ($P < 0.05$) de la SOD hépatique (-25.07%) a été enregistrée chez les animaux traités par le 2,4-D plus sélénium comparativement au lot témoin (figure 24).

3.2.2. Activité enzymatique de la catalase

D'après les résultats obtenus (figure 25, 28) on observe une diminution hautement significative ($P < 0,01$) de l'activité enzymatique de la catalase dans le foie (-28.19 %), les reins (-26.54 %) et significative ($p < 0.05$) dans le cerveau chez les rats traités par le 2,4-D par rapport aux rats témoins. Tandis que les rats traités par EQT et à la combinaison (2,4-D/EQT) ne montrent aucune variation significative de l'activité enzymatique de la catalase dans les organes (foie, reins), en comparant avec le lot témoin. Cependant, la co-administration de EQT au lot recevant le 2,4-D a augmenté l'activité enzymatique significativement comparativement au lot traité uniquement par le 2,4-D. Par ailleurs la co-administration du sélénium avec le 2,4-D a rétabli l'activité enzymatique de la catalase dans le foie et les reins par une augmentation non significative de cette activité comparativement au lot traité uniquement par le 2,4-D.

3.2.3. Activité enzymatique de la glutathion peroxydase

D'après la figure 26 on constate que le traitement des rats avec le 2,4-D a provoqué une diminution significative ($p < 0.05$) de l'activité enzymatique de la glutathion peroxydase (GPx) hépatique (-34.30 %) et rénale (-26.68%). Cependant une augmentation significative ($p < 0.05$) de la GPx cérébrale (+32.12%) a été enregistrée chez les rats traités par le 2,4-D comparativement au lot témoin (figure 28).

En revanche, la co-administration du sélénium avec le 2,4-D a augmenté significativement l'activité enzymatique de la GPx dans le foie, accompagnée d'une augmentation non significative de GPx rénale comparativement au lot traité par le 2,4-D.

Tandis que le traitement avec l'extrait aqueux montre une amélioration non significative dans les organes étudiés ; foie, reins et cerveau par rapport au lot traité par le 2,4-D.

3.2.4. Activité enzymatique de la glutathion - S- transférase

L'administration du 2,4-D chez les rats induit une diminution significative ($p < 0.05$) de l'activité enzymatique de la glutathion S-transférase (GST) dans le foie (-26.15 %), et une diminution non significative dans les reins (-18,49 %) par rapport aux rats témoins. Tandis qu'on enregistre un rétablissement par une augmentation de l'activité de la GST dans le foie, les reins chez les rats recevant les combinaisons le 2,4-D plus l'extrait aqueux et /ou en sélénium comparant aux rats recevant uniquement le 2,4-D (figure 27).

3.2.5. Activité enzymatique de la lactate déshydrogénase cérébrale

Les résultats obtenus montrent une augmentation significative de l'activité enzymatique de lactate déshydrogénase (LDH) dans le cerveau chez le lot traité par le 2,4-D comparativement au lot témoin, par contre on enregistre un rétablissement par une diminution de leur activité chez les lots traités par les combinaisons (2,4-D/EQT) et (2,4-D/Sélénium) par rapport au lot traité par le 2,4-D (figure 28).

3.2.6. Activité enzymatique de l'acétylcholinestérase cérébrale

Une inhibition de l'AChE a été enregistrée dans l'homogénats du cerveau (13.20 % non significatif) chez les rats traités par le 2,4-D (figure 29).

En revanche la co-administration de EQT et ou du sélénium aux rats recevant le 2,4-D a réduit la diminution du taux d'AChE chez le lot traités par le 2,4-D.

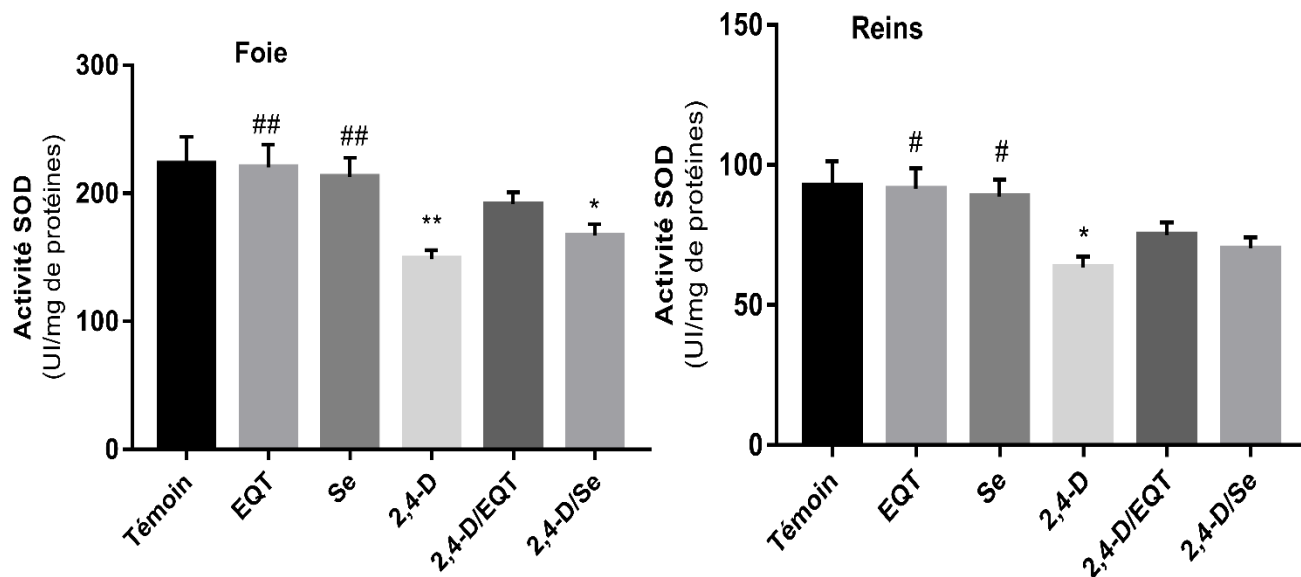


Figure 24. Variation de l'activité enzymatique de la superoxyde dismutase dans le foie et les reins chez les rats témoins et traités.

*p<0.05 ; **p<0,01 : comparativement aux rats témoins ;
 #p<0.05 ; ##p<0,01 : comparativement aux rats traités par le 2,4-D ;

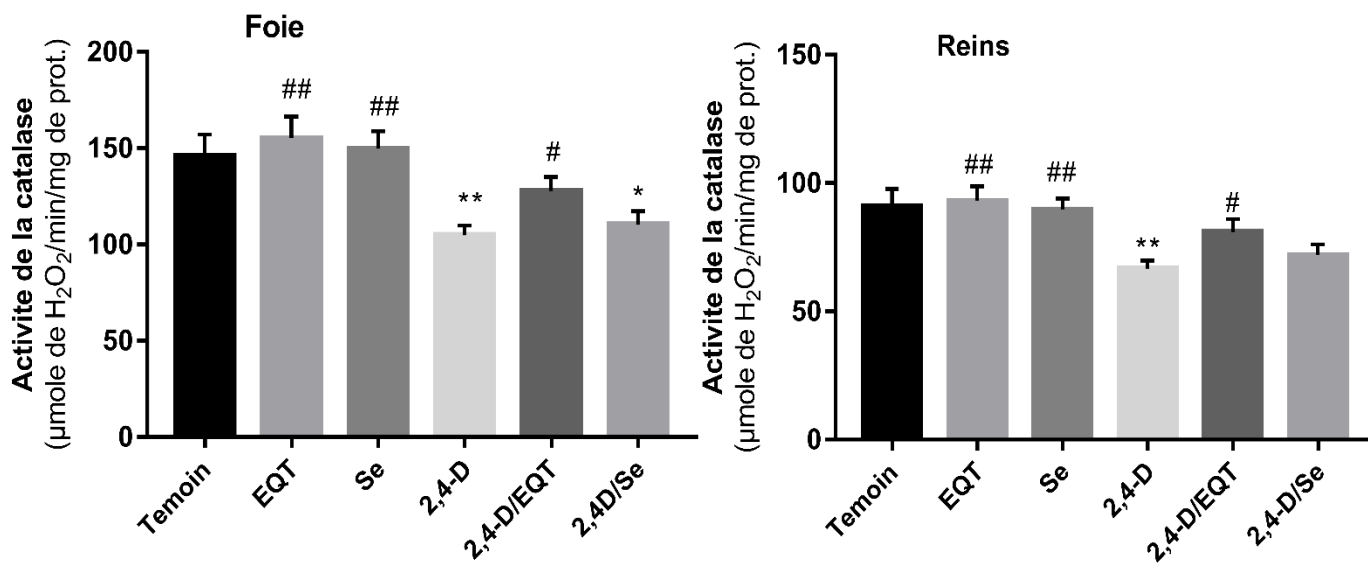


Figure 25. Variation de l'activité enzymatique de la catalase dans le foie et les reins chez les rats témoins et traités pendant 4 semaines de traitement ;

*p<0.05 ; **p< 0,01 : comparativement aux rats témoins ;
 #p<0.05 ; ##p<0,01 : comparativement aux rats traités par le 2,4-D ;

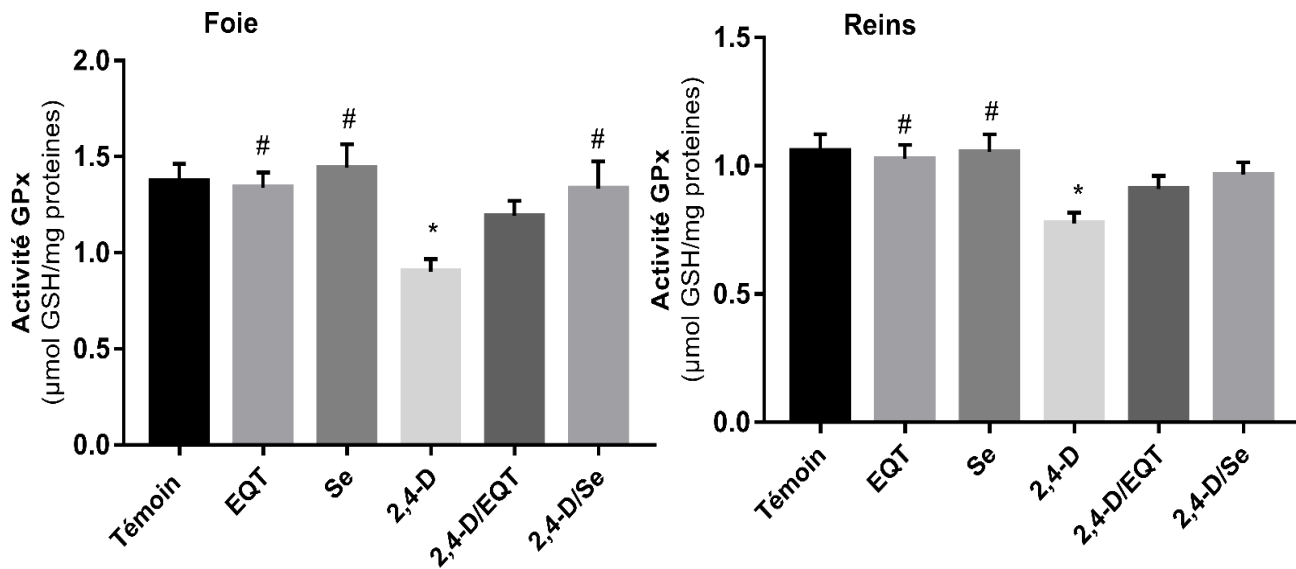


Figure 26. Variation de l'activité enzymatique de la glutathion peroxydase dans le foie et les reins chez les rats témoins et traités pendant 4 semaines de traitement.

* $p < 0.05$: comparativement aux rats témoins ;

$p < 0.05$: comparativement aux rats au rats traités par le 2,4-D ;

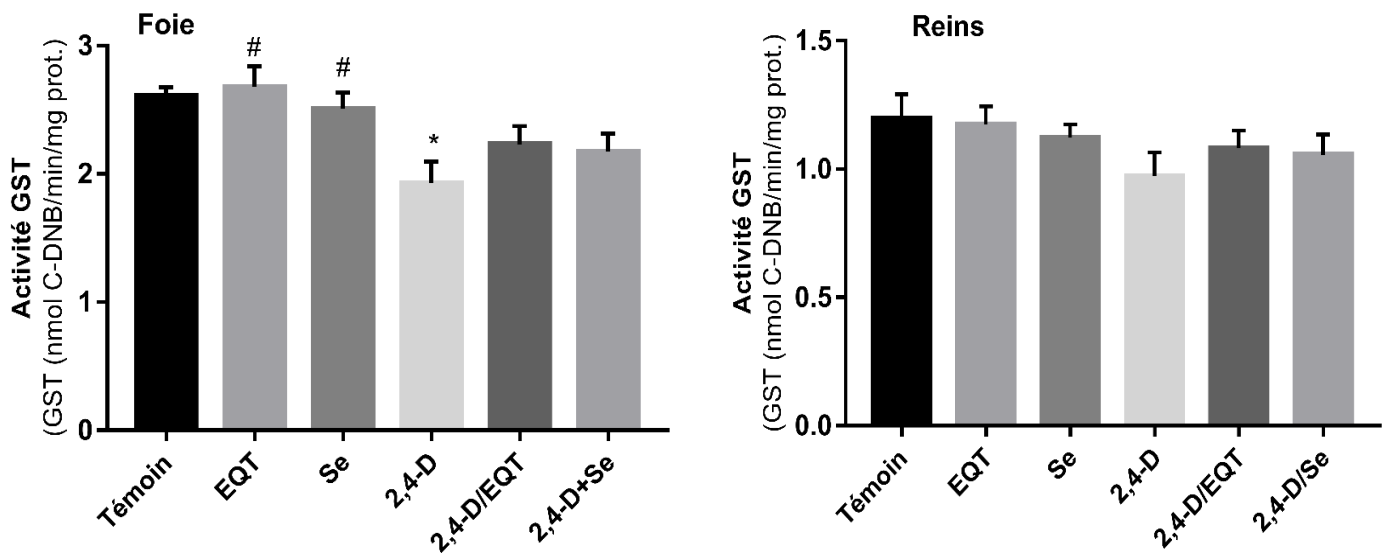


Figure 27. Variation de l'activité enzymatique de la glutathion S transférase dans le foie les et les reins chez les rats témoins et traités.

* $p < 0.05$: comparativement aux rats témoins ;

$p \leq 0.05$: comparativement aux rats traités par le 2,4-D ;

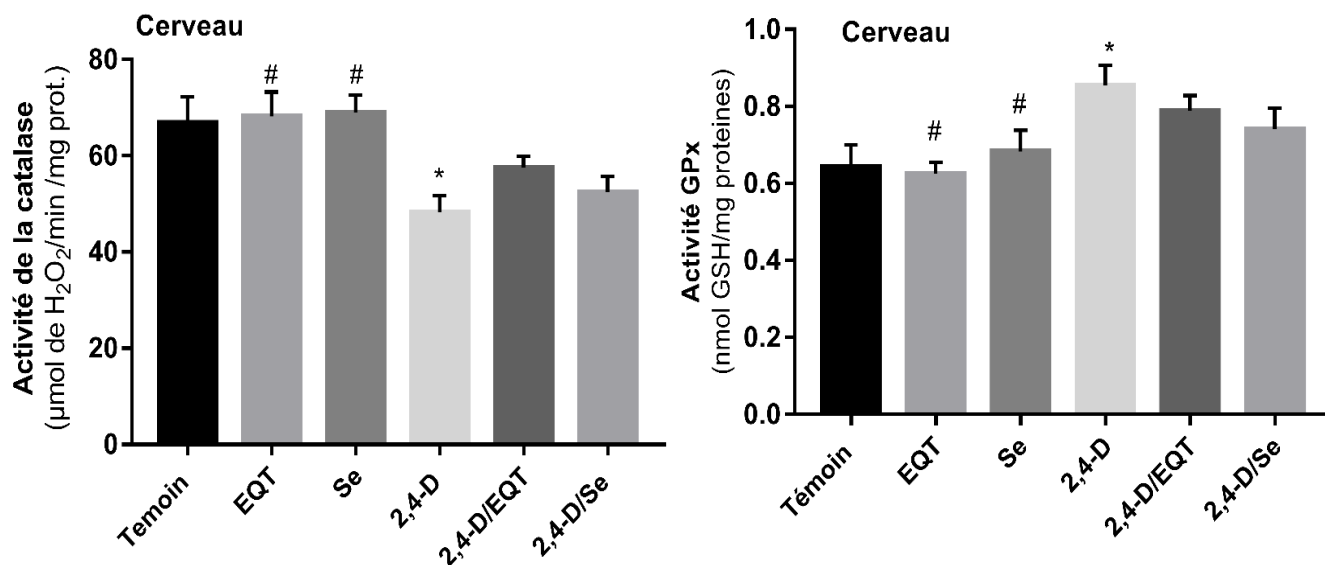


Figure 28. Variation de l'activité enzymatique de la catalase et de l'activité de la glutathion peroxydase chez les rats témoins et traités pendant 4 semaines de traitement.

* p < 0.05 : comparativement aux rats témoins ;
[#] p < 0.05 : comparativement aux rats traités par le 2,4-D ;

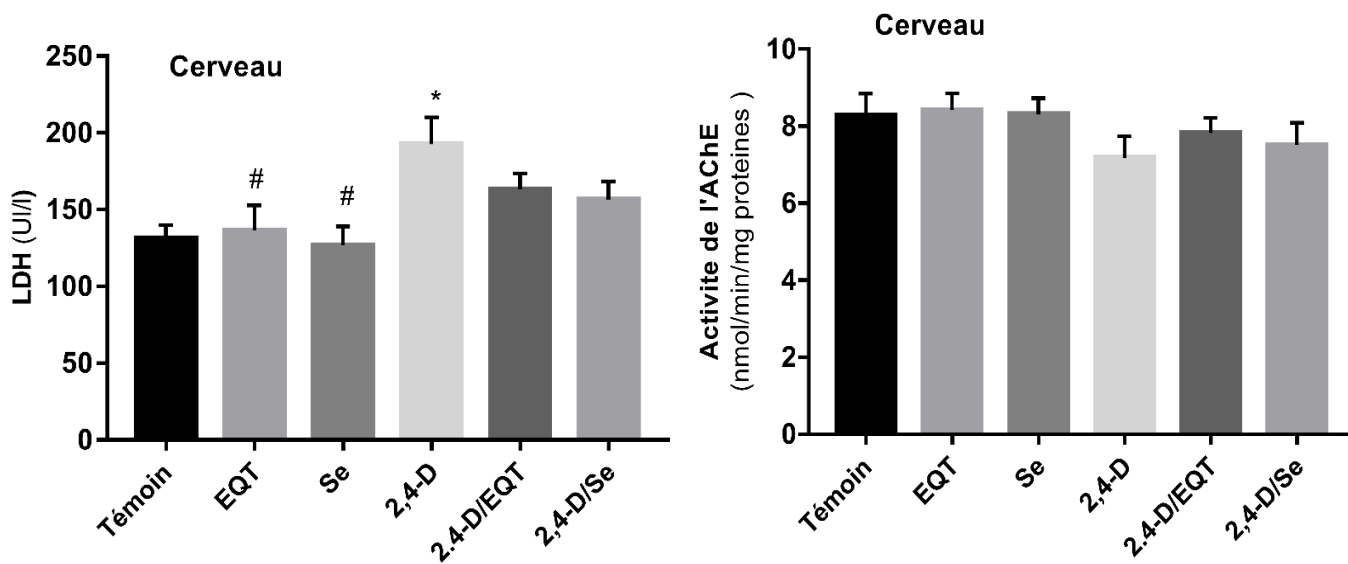


Figure 29. Variation de l'activité enzymatique de la lactate déshydrogénase (UI/L) et de l'activité de l'acétylcholinestérase (nmol/min/mg protéine) cérébrale chez les rats témoins et traités pendant 4 semaines du traitement.

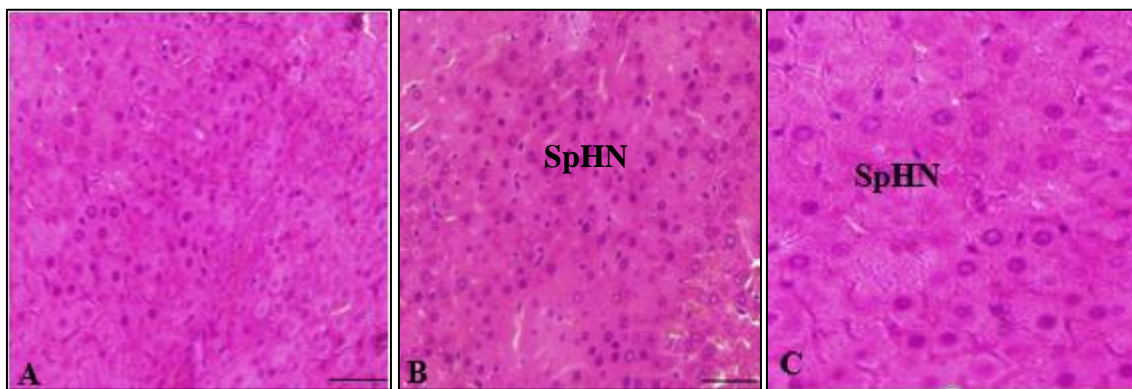
* p < 0.05 : comparativement aux rats témoins ;
[#] p < 0.05 : comparativement aux rats traités par le 2,4-D ;

4. Etude histologique

4.1. Etude histologique du foie

Les microphotographies représentatives de la figure 30 montrent les coupes transversales du tissu hépatique des rats témoins et traités.

L'observation microscopique du foie des rats témoins a révélé une architecture normale du tissu hépatique contenant des veines centro-lobulaires, une architecture lobulaire normale caractérisée par la présence de pores hépatiques (H) séparés par des sinusoides (S) (Figure 30. A et B). Cependant aucune modification histologique n'a été observée dans le foie de groupe traité par EQT (figure 30. C) par rapport au témoin. Chez les animaux du lot 2 traités avec le sélénium l'architecture hépatique est globalement conservée (D). Chez les animaux, recevant le 2,4-D, (figure 30. E, F, G, H, I et J) on note une altération sévère de de l'architecture du tissu hépatique, représentée par une infiltration de cellules mononucléaires avec dégénérescence vacuolaire (DV) autour d'une veine centro-lobulaire dilatée (VC), associée à une congestion des sinusoides hépatiques. En outre, le cytoplasme est apparu largement vacuolé et contenait un grand nombre de gouttelettes lipidiques (J). Tandis que, l'observation microscopique du foie des rats traités par les combinaisons (2,4-D/EQT ; 2,4-D/Se) a montré une architecture normale de cellules hépatiques et nous avons noté une diminution de l'intensité de l'inflammation et la taille de la veine hépatique (K, L, M, N).



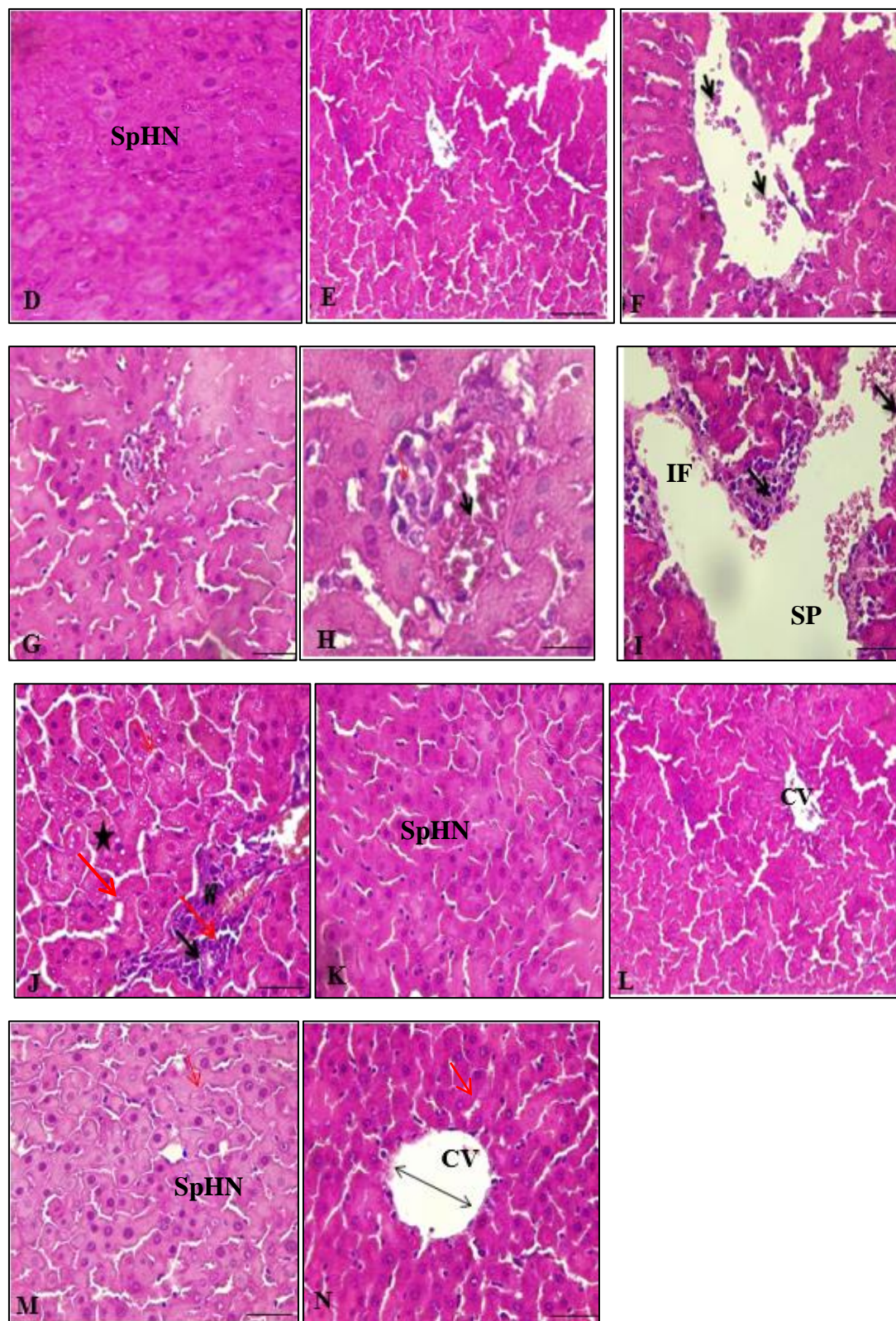


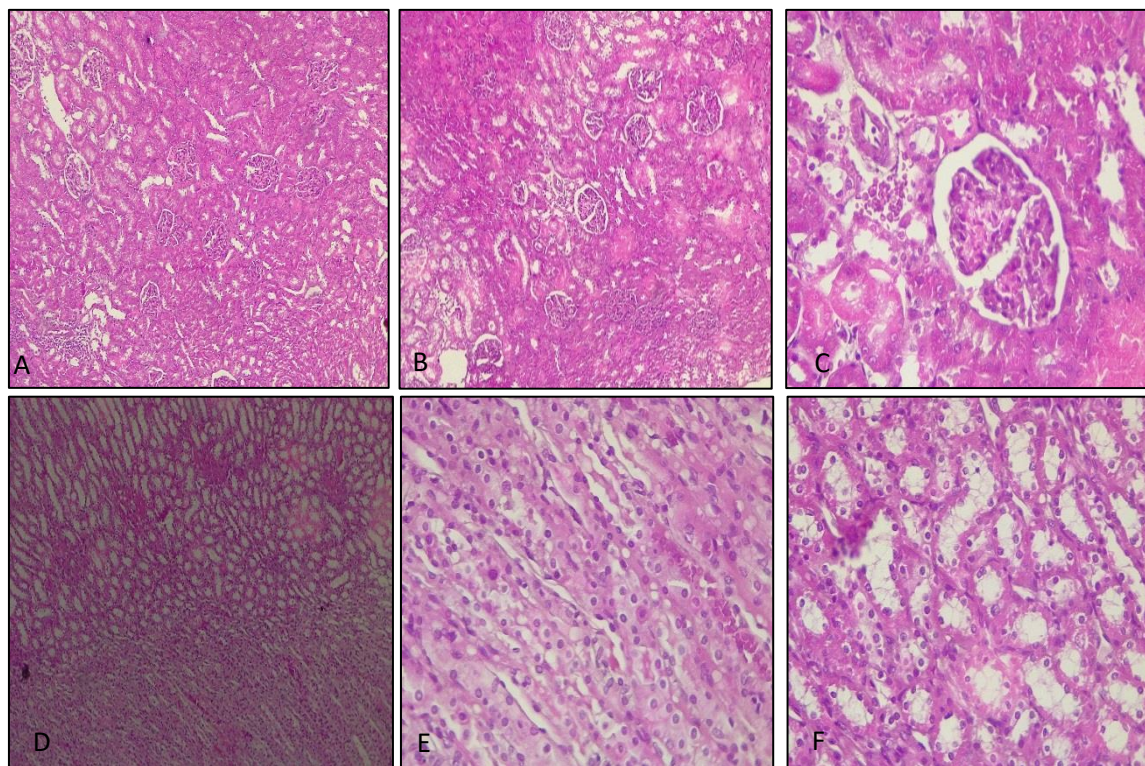
Figure 30. Les coupes histologiques du foie d'un rat témoin et traité, traité par l'extrait aqueux de *Thymus munbyanus* et du sélénium (A, B et C) ; le 2,4-D (E, F, G, H, I et J), la combinaison 2,4-

D/EQT (K et L) et par la combinaison 2,4-D/Se (M et N). La coloration a été réalisée pour détecter les zones fibrotiques (indiquées par des flèches rouges) ; flèches : infiltrations de cellules mononucléaires dans le système portal (SP), Si : inflammation des cellules hépatiques, lipides vacuoles ; CV : veine centrale.

(K, L, M et N) présentent une structure hépatique normale (SpHN). Colorées à Hématéine-Eosine. Les sections ont été observées à un grossissement de $\times 40$ (barres d'échelle : 50 μm).

4.2. Etude histologique des reins

Les microphotographies représentatives des figures ; 31 ,32 des coupes transversales du tissu rénal de tous les lots expérimentaux. Dans la figure (31. A, B, C, D, E et F) la structure normale est mise en évidence avec une apparence normale de glomérule chez les rats témoins et les rats recevant EQT et le sélénium, respectivement. La section de rats traités par le 2,4-D montre une congestion vasculaire (astérisques), ainsi qu'une nécrose segmentaire glomérulaire. Tandis que ces altérations histologiques ont été visiblement réduites par la supplémentation chez les rats recevant le 2,4-D.



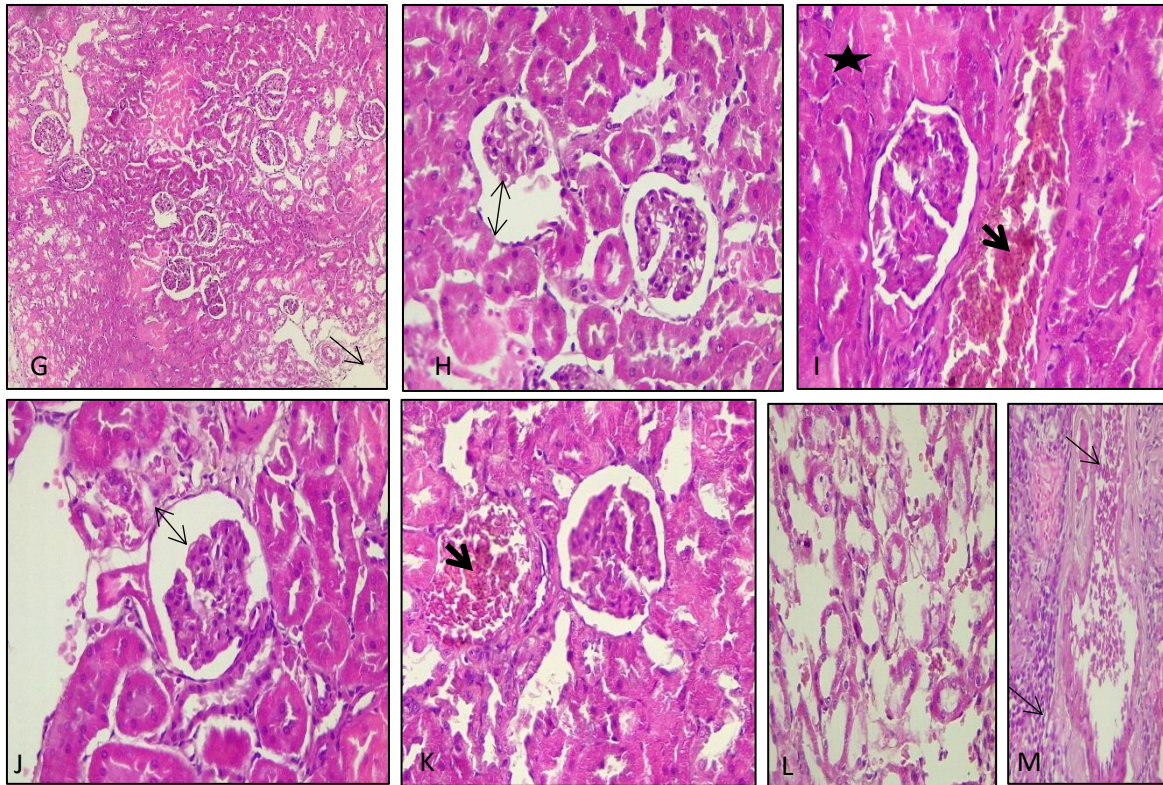


Figure 31. Photomicrographe de l'histologie du tissu rénal chez les rats témoins (A, B, C, D, E et F) et après administration du 2,4-D (G, H, I, J, K et L). Chez les rat témoins, les coupes montrent un tissu rénal normal (a et b) avec une structure glomérulaire (c) et tubulaire distale et proximale (D, E, F) normales. Chez les rats traités par le 2,4-D le tissu rénal montre des altérations dégénératives sévères (G, H, I, J et K) une congestion (\blacktriangledown) et présence d'aire nécrotique (*) avec infiltration des cellules mononucléaires (\rightarrow M) on note aussi une dilatation de l'espace de Bowman (\longleftrightarrow) associée à une atrophie glomérulaire (J et K) et une altération de la structure tubulaire (L) (coloration H&E, 150X et 300X.

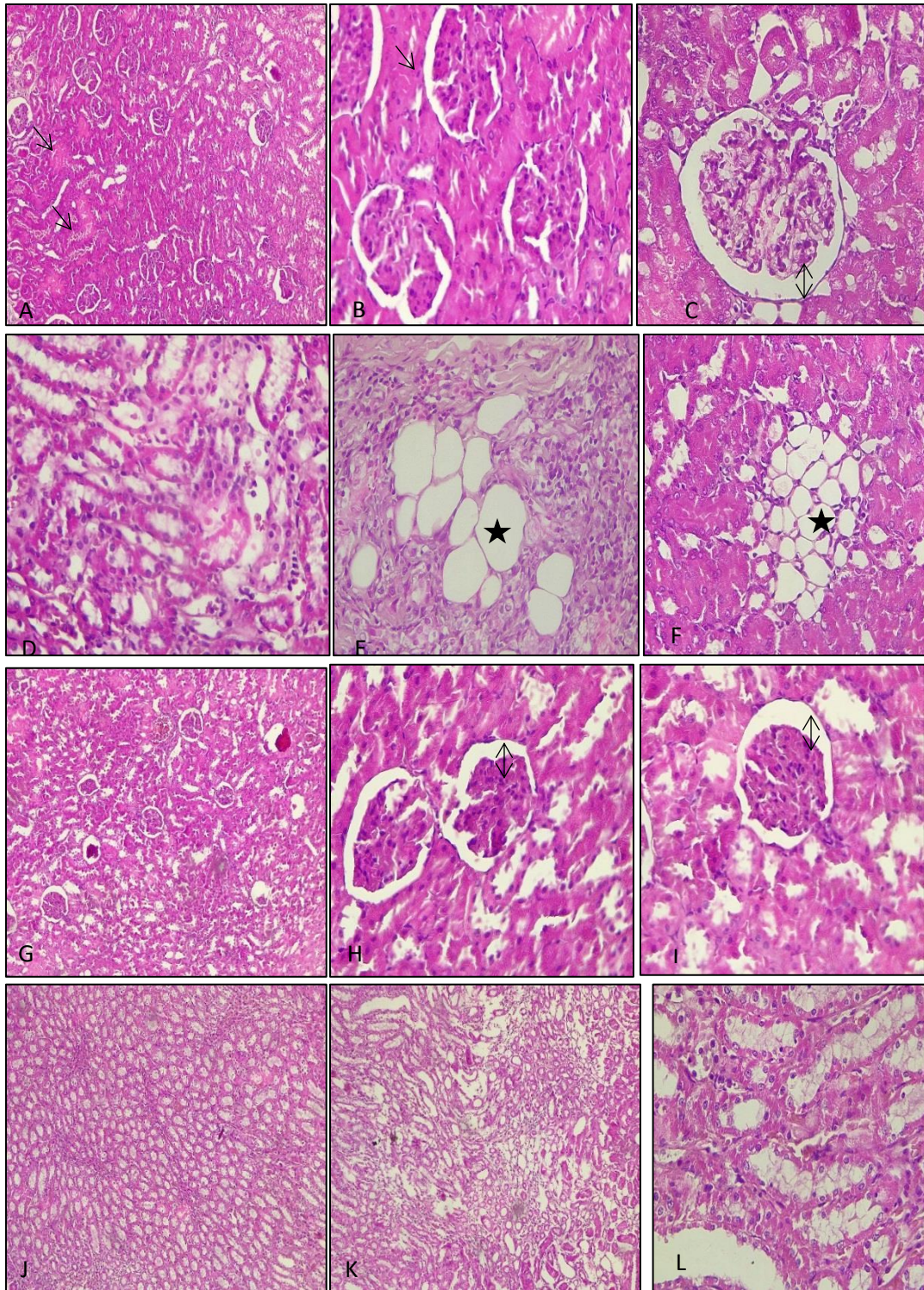


Figure 32. Photomicrographe de l'histologie du tissu rénal chez les rats traités par le 2,4-D plus l'extrait de *Thymus munbyanus* (A, B, C, D, E et F) ainsi chez ceux traités au 2,4-D et sélénium (G, H, I, J, K et L). Les coupes montrent un tissu rénal relativement normal (A, b, C et G, H et I) présentant des altérations moins sévères comparativement observés chez les rats traités par le 2,4-

D. On note une diminution de la dilatation de l'espace de Bowman (\leftrightarrow) associée à un rétablissement de la structure tubulaire (D,J et K). On remarque également la présence de vacuoles lipidiques (*). Coloration H&E, 150X et 300X.

4.3. Etude histologique du cerveau

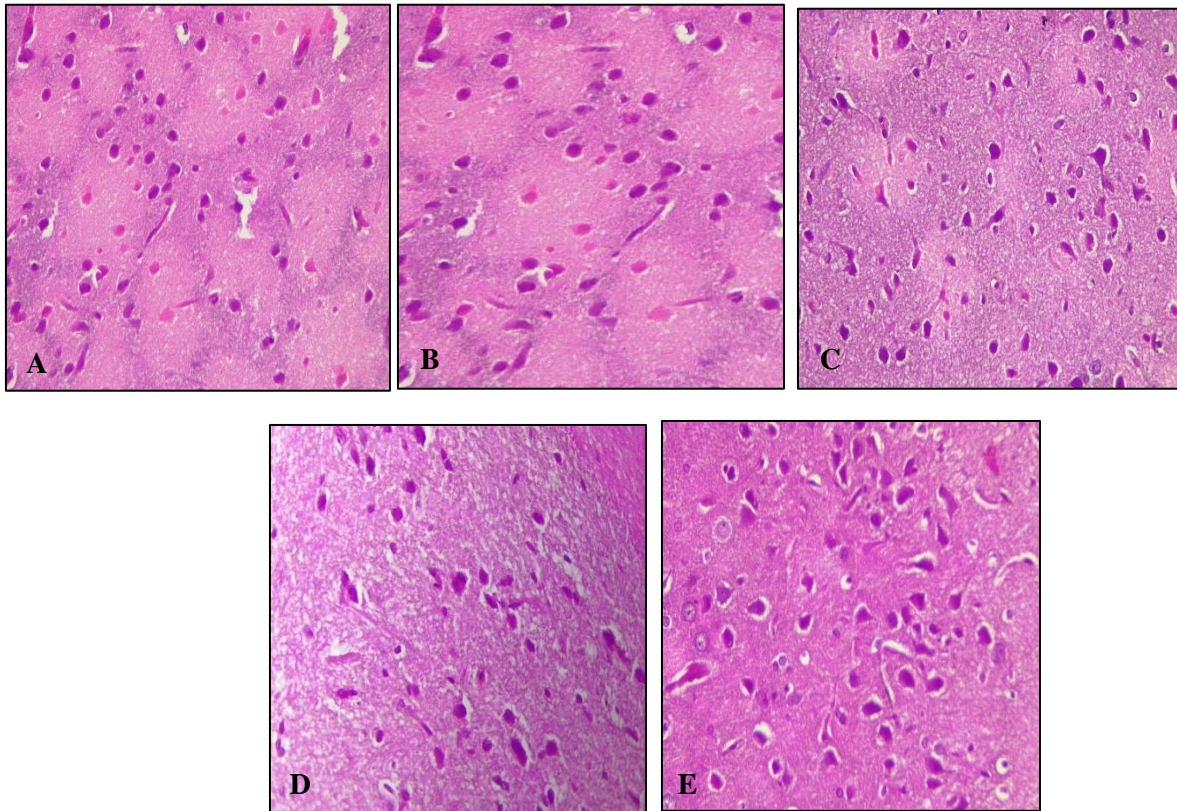
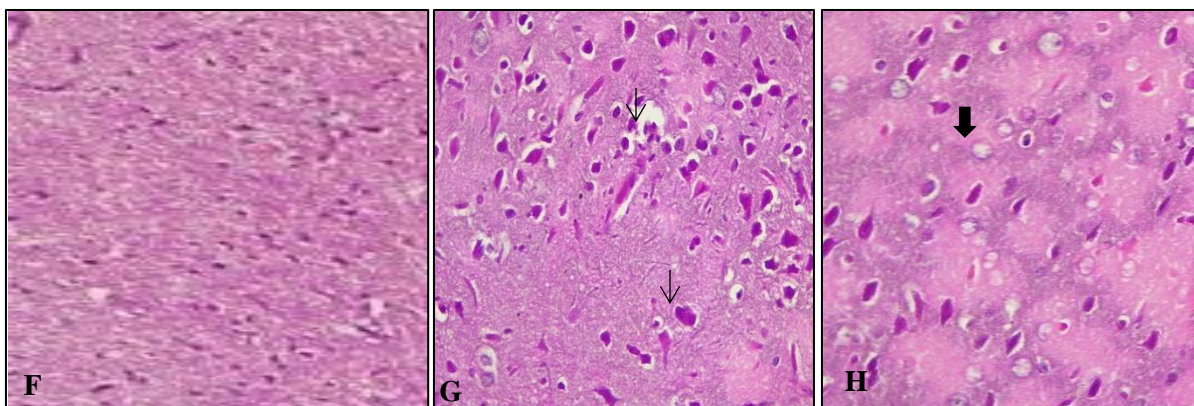


Figure 33. L'examen histologique du tissu nerveux des rats témoins et traités par l'extrait de plante et/ ou sélénium. Le tissu nerveux présente une architecture normale (A, B, C, D et E). Le cortex cérébral montre une couche moléculaire (A et B) et couche des cellules gliales pyramidales (C, D et E). (Coloration H&E 150X).



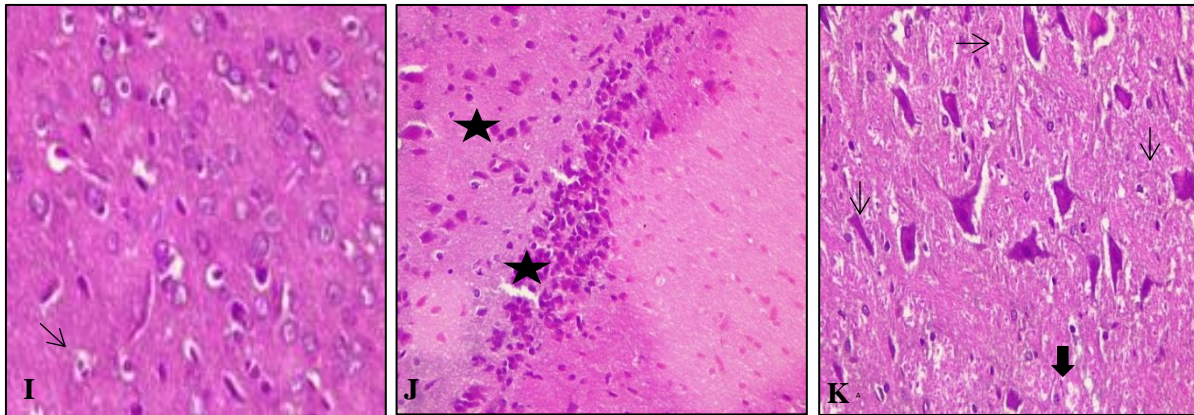


Figure 34. À la suite de l'exposition au 2,4-D, une désorganisation des deux couches a été observée. Un aspect spongieux et une dégénérescence nécrotique ont été observés dans la couche moléculaire (F). Dans la couche des cellules pyramidale, on constate la présence d'une vacuolisation importante autour des cellules pyramidales (flèche noir), caractérisé par l'élargissement du perikaryon (G, H et I). Espace nécrotique (*) et des cellules hyperchromatiques (flèche), atrophie cellulaire, rétrécissement, nécrose cellulaire, pycnose et noyaux sombres. Grandes cellules qui sont principalement multipolaires (flèche longue), présentant un gonflement neuronal et une chromatolyse (J et K) (Coloration H&E 150X).

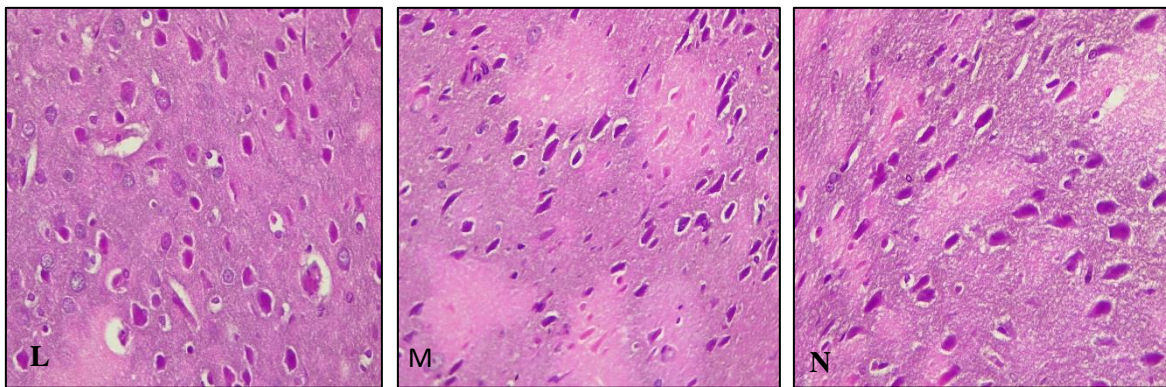


Figure 34. Coupes du tissu neuronal chez les rats traités au 2,4-D et à l'extrait aqueux de *Thymus munbyanus* (L) ou par le sélénium (M et N). On note une diminution des atteintes histopathologiques avec un rétablissement des éléments microstructuraux du cerveau dans les deux couches.

Discussion

Les herbicides à base d'acide phenoxyacétique sont connus par leur accumulation élevée dans le foie et reins via le système de transport de l'acide organique, ce qui conduit à une réduction de la consommation de l'oxygène par les parties corticales rénales et par conséquent entraîne le découplage des mitochondries au niveau des reins qui augmentent la possibilité d'une toxicité secondaire spécifique aux organes (Uyanikgil *et al.*, 2009). La toxicité induite par le 2,4-D semble être médiée par son effet pro-oxydant favorisant une hyper production de radicaux libres. Ces derniers pourraient interagir avec les molécules biologiques tel que les protéines membranaires, mitochondriales, les lipides, l'ADN et causer de ce fait des perturbations du métabolisme cellulaire (Bukowska, 2006 ; Dakhakhni *et al.*, 2016). En effet, nos résultats relatifs aux paramètres indicateurs d'un état de stress oxydant à savoir la concentration de l'MDA, de protéines carbonylées, la teneur en GSH d'une part et de la qualité des réponses de certaines enzymes antioxydante, la catalase, la SOD, la GPx et la GST. D'autre part assoit clairement cette hypothèse.

Nos résultats montrent une augmentation significative des lipoperoxide et des protéines carbonylées associée à une diminution de la concentration du GSH de l'activité de la catalase, de la SOD, de la GPx et de la GST au niveau du foie et des reins chez les rats traités par le 2,4-D à raison de 5 mg/kg pendant 4 semaines. En effet, l'épuisement significatif des niveaux du GSH confirme l'effet potentiel du 2,4-D à induire un état de stress oxydatif au niveau hépatique et rénal. Ce profil de réponse au 2,4-D est en faveur d'un déséquilibre entre les antioxydants et les oxydants (radicaux libres) qui sont capable d'oxyder les lipides en générant déferents aldéhydes comme le MDA, un composé toxique qui pourrait altérer la fluidité et la fonction des membranes (Del Rio *et al.*, 2005 ; Abbassy *et al.*, 2014).

Plusieurs travaux récents ont trouvé des niveaux élevés de l'MDA chez les rats traités par le 2,4-D, ce qui confirme nos résultats (Nakbi *et al.*, 2010 ; Upadhyaya *et al.*, 2018 ; Shafeeq *et Mahboob*, 2019) et qui est considéré comme l'un des principaux mécanismes de lésion tissulaire. Dans une étude récente sur les hépatocytes de souris, Dakhakhni *et al* (2016), indiquent que le 2,4-D provoque une détérioration de la polarité des lipides ce qui les rendent vulnérables aux attaques radicalaires. Nos résultats confirment ceux de Nakbi *et al* (2012) et Tayeb *et al* (2012) et qui ont mis en évidence une altération du statut antioxydant chez des rats traités par le 2,4-D, accompagnée d'une augmentation de la peroxydation lipidique et d'une diminution du taux de GSH cellulaire.

L'augmentation des taux cellulaires de la peroxydation lipidique via une hyper expression du MDA et du taux des protéines carbonylées, la déplétion du GSH et la diminution de l'activité d'un ensemble d'enzyme telle que la CAT, la SOD et la GPx sont des manifestations physiologiques incriminés dans l'apparition des lésions tissulaires. Ce qui confirme les affections histologiques du foie et des reins, En effet, on a noté au niveau des coupes réalisées sur le foie une dilatation des espaces sinusoidales, une congestion de la veine centro-lobulaire ainsi qu'un phénomène de nécrose cellulaire chez les rats recevant le 2,4-D. Nos résultats sont en accord avec ceux de [Nakbi et al \(2012\)](#), qui ont montré que l'exposition au 2,4-D à raison de 5 mg / kg de poids corporel pendant 4 semaines génère des dommages de la vascularisation et stimule l'apoptose des hépatocytes. De même, [Mountassif et al \(2008\)](#) ; [Deshmukh et Ramteke, \(2017\)](#) ont noté des altérations sévères de l'architecture du tissu hépatique accompagnés d'une nécrose cellulaire. En outre, l'administration du 2,4-D a provoqué des dégénérescences tubulaires et glomérulaires accompagnés d'une nécrose tubulaire au niveau des reins. Ce résultat concorde avec d'autres auteurs suite à l'exposition au 2,4-D, [Nakbi et al \(2012\)](#) et [Upadhyaya et al \(2018\)](#), ont signalé une dégénérescence corpusculaire rénale, marquée par une atrophie des glomérules, dégénérescence des cellules épithéliales des tubules contournés distaux et dilatation avec dislocation des bordures en brosse des tubules contourné proximaux.

Plusieurs études ont démontré que les EROs et la peroxydation des lipides, sont des médiateurs importants dans le développement de la neurotoxicité suite à des expositions aux pesticides et principalement le 2,4-D ([Bongiovanni et al., 2007-2011](#)). En effet, le cerveau est fortement susceptible aux radicaux libres dû à leur activité métabolique oxydante accrue et leur teneur élevée en acides gras polyinsaturés. En outre, la distribution des acides gras spécifiques dans les membranes du cerveau indique son rôle dans la régulation de la fluidité membranaire et de l'activité fonctionnelle de ces structures. Le 2,4-D provoque des variations de la composition des acide gras ainsi les modifications biochimiques et fonctionnelles, telles que l'interaction protéine-lipide, la distribution des protéines, la perméabilité de la membrane et le transport des ions ([Amel et al., 2016](#)).

Le cerveau est particulièrement vulnérable aux dommages oxydatifs, cette vulnérabilité est acquise par rapport à sa teneur élevée en acides gras polyinsaturés facilement peroxydables et son taux élevé de la consommation d'oxygène et la teneur faible des enzymes antioxydantes ([Nunomura et al, 2006](#)). En effet l'administration du 2,4-D aux rats a provoqué une augmentation significative

des niveaux de MDA associée à une réduction significative de la teneur en GSH et de l'activité AChE et une diminution de la CAT. L'épuisement significatif des niveaux du GSH confirme l'effet potentiel du 2,4-D à induire, un état de stress oxydatif dans des différents tissus. Des résultats similaires ont été également rapportés chez des rats exposés au 2,4-D au niveau cérébral (Amel et al., 2016). D'autres travaux ont montré un épuisement des réserves énergétiques suite à un stress oxydatif, qui pourrait engendrer une accumulation des neurotransmetteurs au niveau des synapses (Boulland et Levy, 2005). Ce résultat est bien confirmé par la mesure de l'activité de l'acétylcholinestérase qui a diminué significativement au niveau du cerveau après un traitement par le 2,4-D. Ceci pourrait être visualisé par une perturbation du fonctionnement astrocytaire et synaptique suivi d'un dérèglement de la neurotransmission. En outre, il est connu que le 2,4-D provoque des changements dans le système nerveux provoqués par la formation d'un complexe d'herbicide avec l'acétylcholine (Sastry et al., 1997 ; Kalab et Skladal, 1997).

Lactate déshydrogénase est une enzyme clé du métabolisme énergétique vu son implication dans la production du lactate qui est la principale source d'énergie des neurones (Orban et al., 2010). Le dosage de la LDH cérébral confirme ces altérations neuronales ce qui traduit par une augmentation significative de l'activité de cette enzyme qui atteint le double dans les cerveaux des rats traités par le 2,4-D comparativement aux témoins.

Nos résultats montrent que le traitement par le 2,4-D induit un stress oxydatif au niveau du cerveau caractérisé par une inhibition de l'activité CAT. Ces résultats sont en concordance avec ceux obtenus par (Bongiovanni et al., 2007) qui ont rapporté, dans une étude *in vitro* sur des cellules granulaires du cervelet (CGC) du rat que l'activité CAT diminue considérablement suite aux traitements par le 2,4-D. De plus, on a observé une sollicitation de l'activité de la GPx cérébrale chez les rats recevant le 2,4-D. Ceci pourrait être expliqué par l'implication directe de la GPx dans la détoxification et l'élimination du 2,4-D et de ces métabolites. On pense aussi que cette augmentation s'est produite pour compenser la production significative du peroxyde d'hydrogène due à la peroxydation lipidique et à la diminution de leur neutralisation par la CAT après exposition aux pesticides (Messarah et al., 2015).

En revanche, l'administration de l'extrait aqueux aux rats traités par le 2,4-D a amélioré la teneur en GSH, accompagnée d'une diminution des niveaux de l'MDA avec une restauration remarquable de l'activité enzymatique. Ceci peut être expliqué par la présence de substances bioactives qui ont protégé l'oxydation des lipides ou d'autres macromolécules, en neutralisant les radicaux libres,

réduisant ainsi les espèces réactives de l'oxygène, ce qui montre clairement l'efficacité de cet adjuvant à rétablir les perturbations provoquées par le 2,4-D. Cet effet serait dû en partie à ces propriétés antioxydantes qui sont attribuées à ses métabolites actifs, y compris les monoterpènes phénoliques, les flavonoïdes et les tanins, mais aussi aux thymol et carvanol comme composant majoritaires de son huile essentielle et qui est attribuée à la richesse de EQT en composés phénoliques (Sofiane et al., 2015 ; Sadou et al., 2016 ; Bendif et al., 2017). En effet, les composés phénoliques tels que les flavonoïdes, les acides phénoliques, les diterpènes, les saponines et les tanins ont fait l'objet de beaucoup d'attention en raison de leur activité antioxydante élevée (Al-Attar et al., 2017). Ces métabolites pourraient exercer une protection antioxydante *in vivo* par une cascade impliquant les espèces réactives d'oxygène et l'antioxydant hydrophile, ce qui assure une protection de la vitamine E liposoluble et du bêta-carotène, aussi les flavonoïdes peuvent empêcher les dommages oxydatifs par différents mécanismes d'actions ; soit par capture des radicaux hydroxyles, superoxydes, alkoxydes et peroxydes (Hodek et al., 2002), ou par chélation des métaux ou encore l'inhibition des enzymes responsables de la génération des radicaux libres (Van Acker et al., 1996 ; Benavente-Garcia et al., 1997).

Dans la présente étude l'administration du sélénium chez les rats traités par le 2,4-D a pu aussi réduire les niveaux de l'MDA et des protéines carbonylées, ce qui confère au sélénium un rôle important comme bouclier contre l'oxydation des lipides et des protéines. Dans ce sens (Ben amara et al., 2012, Ben Saad et al., 2017). El-Demerdash et Nasr (2014) ont montré que la supplémentation en sélénium sous forme de sélénite de sodium (200 µg / kg / j) a considérablement réduit les TBARS sériques chez des rats traités par un pesticide organophosphoré, le diazinon.

Cet effet antioxydant du sélénium est probablement dû à la modulation des capacités antioxydantes de l'organisme relative à la sollicitation de certaines enzymes. En effet l'administration du sélénium chez le groupe de rats traité par le 2,4-D a entraîné une amélioration considérable des activités enzymatiques de la GPx, CAT, la GST et de la SOD. En tant que cofacteur de nombreuses enzymes antioxydantes telles que la glutathion peroxydase GPx, la thiorédoxine réductase. Le sélénium peut empêcher la formation de radicaux libres via l'augmentation de l'activité de ces enzymes dans les tissus cibles (Bellinger et al., 2009 ; Ben-Saad et al., 2017. Ansar et al., 2017. Mansour et al., 2017). Les travaux récents de Xia et al. (2016) sur les hépatopancréas, les branchies et les hémocytes d'*Anodontawoodiana*, bivalve d'eau douce exposée au 2,4-DCP, au 2, 4,6-TCP et au PCP ont mis en évidence le rôle crucial de la glutathion

peroxydase dépendante du sélénium dans la suppression du stress oxydatif. En outre cet effet protecteur du sélénium a été aussi rapporté par [Messarah et al \(2012\)](#) et par [Djeffal et al \(2015\)](#) vis-à-vis à la toxicité de l'arsenic et du méthomyl respectivement.

CONCLUSION ET PRESPECTIVES

Conclusion

L'évaluation quantitative du contenu en polyphénols totaux, flavonoïdes et les tanins montre la richesse de *Thymus munbyanus* par ces métabolites secondaires.

Retenons également que la plante est très riche en polyphénols, lesquels ont des activités antioxydantes qui contribuent de manière très efficace à la prévention de nombreuses maladies. C'est ainsi que nous avons confirmé ce potentiel thérapeutique dans la protection contre la cytotoxicité via une étude *in vivo*.

En ce qui concerne l'étude *in vivo*, nos résultats montrent dans un premier temps que l'administration *per os* du 2,4-D à raison de 5 mg/kg de poids corporel chez les rats pendant 30 jours a provoqué des perturbations au niveau de la fonction hépatique, rénale et au niveau cérébral, se traduisant par une augmentation des marqueurs biochimiques de la fonction rénale et hépatique. Dans un second temps, nos résultats montrent que le traitement prophylactique utilisé, à savoir l'extrait aqueux à raison de 10 ml /kg de poids corporel et ou le sélénium à raison de 02 mg /kg amélioré la plus parts des paramètres étudiés.

Les résultats obtenus nous ont permis de conclure que :

L'administration du 2,4-D chez les rats a engendré des perturbations au niveau de la croissance générale des rats :

- Diminution non significative du poids corporel durant la période de traitement
- Augmentation du poids absolu et relatif du foie
- Diminution du poids absolu et relatif des reins et du cerveau

Des perturbations au niveau de certains paramètres biochimiques biomarqueurs de la fonction hépatique :

- Une augmentation significative de la concentration sérique (des transaminases, la phosphatase alcaline, lactate déshydrogénase et la bilirubine), associée à une diminution en protéines totales et en albumine

Des perturbations au niveau de certains paramètres biochimiques biomarqueurs de la fonction rénale :

- Une augmentation significative de la concentration sérique en créatinine et acide urique chez les rats traités par le 2,4-D par rapport aux rats témoins, ce qui confirme l'effet néphrotoxique du 2,4-D

- Une diminution de la teneur en glutathion réduit (GSH), de l'activité enzymatique de la superoxyde dismutase (SOD), de la catalase (CAT), de la glutathion peroxydase (GPx), de la glutathion S-transférase (GST) et de l'acétyl cholinestérase cérébrale, associée à une augmentation du taux de MDA et de protéines carbonylées dans les organes étudiés avec une augmentation de la GPx cérébrale.

L'administration de l'extrait aqueux de *Thymus munbyanus* et ou de sélénium chez les rats traités par le 2,4-D a provoqué :

- Une amélioration au niveau de la croissance générale des rats
- Une baisse de la peroxydation lipidique et des protéines carbonylées hépatique rénale et de MDA cérébrale révélée par une diminution significative du taux d'MDA
- Une restauration des niveaux des biomarqueurs biochimiques de la fonction hépatique.
- Une restauration des niveaux des biomarqueurs de la fonction rénale urée, créatinine et acide urique.
- Un rétablissement du taux du GSH et de l'activité des enzymes antioxydantes.

En perspective, Il s'avère intéressant d'approfondir ces travaux de recherche par :

- L'évaluation de la toxicité du 2,4-D sur des périodes plus longues afin mettre en évidence les effets nocifs chroniques.

-L'identification des composés actifs contenus dans l'extrait aqueux de *Thymus munbyanus* par LC MS/MS : Ce qui permettra certainement d'approfondir les connaissances sur les flavonoïdes et tanins dont les activités biologiques sont sans contestations et également cerner d'une manière plus pointue les différentes actions possibles de ces composés et leur synergie.

-Caractériser de nouvelles substances bioactives naturelles pourra répondre aux différents problèmes de santé et d'être une alternative aux médicaments synthétiques.

-Développer des médicaments a activités anti-radicalaires à base de plantes doués de facultés antioxydante.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

A

- Achour, S., Khelifi, E., Attia, Y., Ferjani, E., Hellal, A.H. (2012). Concentration of Antioxidant Polyphenols from *Thymus capitatus* extracts by Membrane Process Technology. *Journal of Food Science*. 77 (6): 703-709.
- Abbassy, MA., Marzouk, MA., Mansour SA., Shaldam, HA., Mossa., A H. (2014). Impact of oxidative stress and lipid peroxidation induced by lambda cyhalothrin on p450 in male rats: the ameliorating effect of zinc. *J. Environ. Anal. Toxicol.* 4, 1-5.
- Aebi H (1984) Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 105 ,121-126
- Ahmadi, A., Heidarian, E., Ghatreh-Samani, K. (2019). Modulatory effects of artichoke (*Cynara scolymus L.*) leaf extract against oxidative stress and hepatic TNF- α gene expression in acute diazinon-induced liver injury in rats. *Journal of basic and clinical physiology and pharmacology*, 30(5).
- Al-Attar, A. M., Elnaggar, M. H., Almalki, E. A. (2017). Protective effect of some plant oils on diazinon induced hepatorenal toxicity in male rats. *Saudi journal of biological sciences*.24(6), 1162-1171.
- Al-Baroudi, D. A., Arafat, R., El-kholy, T. (2014). Hepatoprotective effect of *chamomile capitula* extract against 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid-induced hepatotoxicity in rats. *Life Sci J*.11,34-40.
- Allessio, H.M. (1993). Exercise-induced oxidative stress. *Med. Sci. Sports Exerc.*25, 218-224.
- Amarti, F., El Ajjouri, M., Ghanmi, M., Satrani, B., Aafi, A., Farah, A., ... and Chaouch, A. (2011). Composition chimique, activité antimicrobiennne et antioxydante de l'huile essentielle de *Thymus zygis* du Maroc. *Phytothérapie*. 9(3), 149.
- Amamra, S., Cartea, M. E., Belhaddad, O. E., Soengas, P., Baghiani, A., Kaabi, I., Arrar, L. (2018). Determination of total phenolics contents, antioxidant capacity of *Thymus vulgaris* extracts using electrochemical and spectrophotometric methods. *Int. J. Electrochem. Sci*, 13, 7882-7893.
- Amel, N., Wafa, T., Samia, D., Yousra, B., Issam., C, Cheraif, I., Mohamed, H. (2016). Extra virgin olive oil modulates brain docosahexaenoic acid level and oxidative damage caused by 2, 4-Dichlorophenoxyacetic acid in rats. *Journal of food science and technology*. 53(3), 1454-1464.

- Amiot, M. J., Riollet, C., & Landrier, J. F. (2009). Polyphénols et syndrome métabolique : Polyphenols and metabolic syndrome. *Médecine des Maladies Métaboliques*, 3(5), 476-482.
- Amin, I., Tan, S. H. (2002). Antioxidant activity of selected seaweeds. *Malaysian Journal of Nutrition*, 8, 167–177.
- Ansar, S., Alshehri, SM., Abudawood, M., Hamed SS., Ahamad., T. (2017). Antioxidant and hepatoprotective role of selenium against silver nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*. 12,7789–7797.
- Arigony, A. L. V., de Oliveira, I. M., Machado, M., Bordin, D. L., Bergter, L., Prá, D., Pegas Henriques, J. A. (2013). The influence of micronutrients in cell culture: a reflection on viability and genomic stability. *BioMed research international*.2013.
- Aydin, H., Ozdemir, N., Uzunören, N. (2005). Investigation of the accumulation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) in rat kidneys. *Forensic Sci Int*. 153,53–57.

B

- Bailey, SA., Zidell, RH., Perry, R. W. (2004). Relationships between organ weight and body/brain weight in the rat: what is the best analytical endpoint? *Toxicologic Pathology*. 32(4),448-466
- Bashan, N., Kovsan, J., Kachko, I., Ovadia, H., Rudich, A. (2009). Positive and negative regulation of insulin signaling by reactive oxygen and nitrogen species. *Physiological reviews*.89(1), 27-71.
- Bekhechi, C., Bekkara, F. A., Abdelouahid, D. E., Tomi, F., and Casanova, J. (2007). Composition and Antibacterial Activity of the Essential Oil of *Thymus fontanesii* Boiss. et Reut. from Algeria. *Journal of Essential Oil Research*. 19(6), 594-596.
- Belmalha, S., El Idrissi, M., Amechrouq, A., and Echchgadda, G. (2015). Caractérisation chimique de certaines espèces de Thym Marocain du moyen Atlas (region de Midelt). *Glob J Pure App Chem*. 3(2), 43-52.
- Ben Amara, I., Soudani N., Troudi, A., Bouaziz, H., Boudawara, T., Zeghal, N. (2011). Antioxidant effect of vitamin E and selenium on hepatotoxicity induced by dimethoate in female adult rats. *Ecotoxicol Environ Saf*. 74, 811-819.

- Benavente-García, O., Castillo, J., Marin, F. R., Ortuño, A., & Del Río, J. A. (1997). Uses and properties of citrus flavonoids. *Journal of agricultural and food chemistry*. 45(12), 4505-4515.
- Benchabane, O., Hazzit, M., Baaliouamer, A., Mouhouche, F. (2012). Analysis and Antioxidant Activity of the Essential Oils of *Ferula vesceritensis* Coss. *et Dur.* and *Thymus munbyanus* Desf. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*. 15, 774-781.
- Bencheikh, S. (2010). Les pesticides : définition, classification et données de toxicovigilance. *Toxicologie*. 4, 1-16.
- Bendif, H., Boudjeniba, M., Miara, M. D., Biqiku, L., Bramucci, M., Lupidi, G., ... et Maggi, F. (2017). Essential oil of *Thymus munbyanus* subsp. *coloratus* from Algeria: Chemotypification and in vitro biological activities. *Chemistry and biodiversity*.14(3), e1600299.
- Ben-Saad, H., Kammoun, I., Boudawara, T., Zeghal, KM., Hakim, A., Amara., IB. (2017). Effects of Selenium on Tebuconazole-Induced Hepatotoxicity in Adult Rats. *Res Rev Biosci*. 12(2),117.
- Beyer, WF., Fridovich, I. (1987). Assaying for superoxide dismutase activity. *Anal Biochem*.161 ,559-66.
- Birk, J., Meyer, M., Aller, I., Hansen, H. G., Odermatt, A., Dick, T. P., ... and Appenzeller-Herzog, C. (2013). Endoplasmic reticulum: reduced and oxidized glutathione revisited. *J Cell Sci*. 126(7), 1604-1617.
- Board, P. G., Coggan, M., Chelvanayagam, G., Eastal, S., Jermin, L. S., Schulte, G. K., Rosner, M. H. (2000). Identification, characterization, and crystal structure of the Omega class glutathione transferases. *Journal of Biological Chemistry*, 275(32), 24798-24806.
- Boers, D., Portengen, L., Bueno-de-Mesquita, H. B., Heederik, D., and Vermeulen, R. (2010). Cause-specific mortality of Dutch chlorophenoxy herbicide manufacturing workers. *Occupational and environmental medicine*, 67(1), 24-31.
- Boizot, N., and Charpentier, J. P. (2006). Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. *Le Cahier des Techniques de l'INRA*, In: Numéro special. 79-82.
- Bolognesi, C., Merlo, FD. (2011). Pesticides: human health effects. In: Nriagu JO, editor. *Encyclopedia of environmental health*. Burlington: Elsevier. 438-45.

- Bongiovanni, B., De Lorenzi, P., Ferri, A., Konjuh, C., Rassetto, M., De Duffard, A. E., Duffard, R. (2007). Melatonin decreases the oxidative stress produced by 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid in rat cerebellar granule cells. *Neurotoxicity research*. 11(2), 93.
- Bongiovanni, B., Ferri, A., Brusco, A., Rassetto, M., Lopez, L. M., de Duffard, A. E., Duffard, R. (2011). Adverse effects of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid on rat cerebellar granule cell cultures were attenuated by amphetamine. *Neurotoxicity research*. 19(4), 544-555.
- Bonnard, N., Brondeau, M. T., Jargot, D., Pillière, F., Schneider, O., Serre, P. (2011). Fiche toxicologique. Sélénium et composés. Available online : <http://www.inrs.fr/default/dms/inrs/FicheToxicologique/TI-FT.../ft150.pdf>
- Bonnard, N., Jargot, D., Falcy, M., Fastier, A., Oudar, S., Rambourg, M.O (2011). Fiche toxicologique. 2,4-D, ses sels et esters -. Available online : www.inrs.fr/fichetox /pdf (accessed on 1 October 2019).
- Boros, B., Jakabová, S., Dörnyei, Á., Horváth, G., Pluhár, Z., Kilár, F., & Felinger, A. (2010). Determination of polyphenolic compounds by liquid chromatography–mass spectrometry in *Thymus* species. *Journal of Chromatography A*. 1217(51), 7972-7980.
- Boubali, Z (2017). Biomarqueurs du stress oxydatif. Université Mohammed v rabat (Doctorat dissertation).
- Bouguerne B. (2012). Conception et synthèse de dérivés phénoliques hautement fonctionnalisés et étude de leurs propriétés biologiques vis-à-vis des maladies cardiovasculaires (athérosclérose). Thèse de doctorat. Université Toulouse, Toulouse, 198p.
- Boulland, J. L., Levy, L. M. (2005). Glutamate, glutamine and ischaemia in the central nervous system. *Tidsskrift for den Norske laegeforening: tidsskrift for praktisk medicin, ny raekke*.125(11), 1479-1481.
- Bourguet, D., Guillemaud, T. (2016). The hidden and external costs of pesticide use. In *Sustainable Agriculture Reviews*. Springer, Cham.35-120.
- Bouseba, B. (2011). Etude de la biodégradation de l'herbicide acide 2, 4-dichlorophenoxyacétique (2, 4-d) dans des sols agricoles de la région de Constantine ((Doctoral dissertation).
- Bousmaha-Marroki, L., Atik-Bekkara, F., Tomi, F., Casanova, J. (2007). Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of *Thymus ciliatus* (Desf.) Benth. ssp. *eu-ciliatus* Maire from Algeria. *Journal of Essential Oil Research*, 19(5), 490-493.
- Boyd, R. (2011). Selenium stories. *Nature chemistry*, 3(7), 570.

- Bradberry, S. M., Proudfoot, A. T., & Vale, J. A. (2004). Poisoning due to chlorophenoxy herbicides. *Toxicological reviews*, 23(2), 65-73.
- 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 ,248-254.
- Bruneton, J. (2009). *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales* (4e ed.). Paris: Lavoisier, 2009. 1289 p.
- Brenneisen, P., Steinbrenner, H., Sies, H. (2005). Selenium, oxidative stress, and health aspects. *Molecular aspects of medicine*.26(4-5), 256-267.
- Brusco, A., Saavedra, J. P., García, G., Tagliaferro, P., de Duffard, A. E., Duffard, R. (1997). 2, 4-Dichlorophenoxyacetic acid through lactation induces astrogliosis in rat brain. *Molecular and chemical neuropathology*. 30(3), 175-185.
- Buege, JA, Aust, SD (1984) Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 105:302–310.
- Bukowska B (2006) Toxicity of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid - Molecular mechanisms. *Polish Journal of Environmental Studies*. 15:365–374.
- Bukowska, B., Bors, M., Gulewicz, K., Koter-Michalak, M. (2012) *Uncaria tomentosa* extracts protect human erythrocyte catalase against damage induced by 2, 4-D-Na and its metabolites. *Food and chemical toxicology*. 50(6), 2123-2127.
- Bus, JS., Hammond, LE. (2007). Regulatory progress, toxicology, and public concerns with 2,4-D: Where do we stand after two decades. *Crop Protection*. 26, 266-269.

C

- Camarena, V., Wang, G. (2016). The epigenetic role of vitamin C in health and disease. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73(8), 1645-1658.
- Caramori, G., Papi, A. (2004). Oxidants and asthma. *Thorax*.59(2), 170-173.
- Carange, J. (2010). *Rôle antioxydant et anti-apoptotique des brassinostéroïdes, une nouvelle stratégie de neuroprotection ?* (Doctoral dissertation, Université du Québec à Trois-Rivières).
- Celik, I., Tuluçe Y., Isik, I. (2006). Influence of subacute treatment of some plant growth regulators on serum marker enzymes and erythrocyte and tissue antioxidant defense and lipid peroxidation in rats. *Journal of Biochemistry and Molecular Toxicology*. 20, 174–182.
- Ceriello, A. (2008). Possible role of oxidative stress in the pathogenesis of hypertension. *Diabetes care*, 31(Supplement 2), S181-S184.

- Cervantes Gracia, K., Llanas-Cornejo, D., Husi, H. (2017). CVD and oxidative stress. *Journal of clinical medicine*. 6(2), 22.
- Coggon, D., Ntani, G., Harris, E. C., Jayakody, N., & Palmer, K. T. (2015). Soft tissue sarcoma, non-Hodgkin's lymphoma and chronic lymphocytic leukaemia in workers exposed to phenoxy herbicides: extended follow-up of a UK cohort. *Occup Environ Med*, 72(6), 435-441.
- Congo, M., (2012). Etude des propriétés antiradicalaire et antiproliferative d'extraits de feuilles et de rameaux de *Salvadora Persica L.* (Salvadoraceae). Thèse de pharmacie de l'Université d'Ouagadougou Burkina Faso, 42.
- Cooke, M. S., Evans, M. D., Dizdaroglu, M., et Lunec, J. (2003). Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *The FASEB Journal*. 17(10), 1195-1214.
- Crozier, A., Clifford, M. N., Ashihara, H. (Eds.). (2008). *Plant secondary metabolites: occurrence, structure and role in the human diet*. John Wiley & Sons.

D

- Dakhakhni, TH., Raouf, GA., Qusti, SY. (2016). Evaluation of the toxic effect of the herbicide 2, 4-D on rat hepatocytes: an FT-IR spectroscopic study. *European Biophysics Journal*. 45,311–320.
- Dar, R. A., Brahman, P. K., Khurana, N., Wagay, J. A., Lone, Z. A., Ganaie, M. A., Pitre, K. S. (2017). Evaluation of antioxidant activity of crocin, podophyllotoxin and kaempferol by chemical, biochemical and electrochemical assays. *Arabian Journal of Chemistry*. 10, S1119-S1128.
- Davies, M. J. (2016). Protein oxidation and peroxidation. *Biochemical Journal*.473(7), 805-825.
- DEFRA (1993). Pesticide Safety Directorate. Evaluation of fully approved or provisionally approved products: evaluation on 2,4-D dichlorophenoxy acetic acid and its salts and esters. (Food and Environmental Protection Act,1985, Part III) issue n°68.
- DG SANCO (2001). Review report for the active substance 2,4-D. Finalised in the standing Committee on Plant Health at its meeting on 2 October 2001 in view of the inclusion of 2,4-D in Annexe I of Directive 91/414/EEC. (7599/VI/97-final), European Commission - Health and consumer protection directorate general.

- Deshmukh, US., Ramteke, PM. (2017). Hematological, biochemical alterations, and changes in histological architecture of some tissue of male Wistar rats exposed to 2, 4-D- herbicide. *European Journal of Environmental Ecology*. 4, 17–21.
- Di Paolo, O., de Duffard, A. M. E., Duffard, R. (2001). In vivo and in vitro binding of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid to a rat liver mitochondrial protein. *Chemico-biological interactions*. 137(3), 229-241.
- Djeffal, A., Messarah, M., Boumendjel, A., et al. (2015). Protective effects of vitamin C and selenium supplementation on methomyl-induced tissue oxidative stress in adult rats. *Toxicology and industrial health*. 31(1),31-43.
- Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P., Vidal, N. (2006). Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food chemistry*. 97(4), 654-660.
- Dob, T., Dahmane, D., Benabdelkader, T., Chelghoum, C. (2006). Studies on the essential oil composition and antimicrobial activity of *Thymus algeriensis Boiss. et Reut.* *International Journal of Aromatherapy*. 16(2), 95-100.
- Dow Chemical Company (1983). Accession No. 251473. Available from EPA. Write to FOI, EPA, Washington, DC 20460
- Droge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological reviews*. 82(1), 47-95.
- Ducros, V., Favier, A. (2004). Métabolisme du sélénium. *EMC-endocrinologie*.1(1), 19-28.
- Dutta, K., Ali, M., Najam, A., Kumar, R., Kumar, A. (2014). Ameliorative effect of seed extract of *Pterocarpus santalinus* on coragen induced haematological alterations and serum biochemical changes in Charles Foster rats. *Journal of Toxicology and Environmental Health Sciences*. 6(10), 194-202.
- Dwassy, A. (2014). Espèces réactives de l’oxygène et stress oxydant : aspects biologiques et pathologiques (Doctoral dissertation).

E

- El-Demerdash, FM., Nasr, HM. (2014). Antioxidant effect of selenium on lipid peroxidation, hyperlipidemia and biochemical parameters in rats exposed to diazinon. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 28: 89-93.

- Ellman G.L., Courtney K.D., ANDRES V., Featherstone R.M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*. 7: 88-95.
- Eltayeb, AA., Liu, Q., Ganl ,L., Liu H, XH.(2004). Antagonistic effect of scutellarin on the toxicity of selenium in rat livers. *Biol Trace Elem Res*. 98(3), 253-264.
- Elzoghby, R. R., Ahlam, F. H., Abdel-Fatah, A., Farouk, M. (2014). Protective role of vitamin C and green tea extract on malathion-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity in rats. *American Journal of Pharmacology and Toxicology*. 9(3), 177.
- Engwa, G. A. (2018). Free Radicals and the Role of Plant Phytochemicals as Antioxidants Against Oxidative Stress-Related Diseases. *Phytochemicals: Source of Antioxidants and Role in Disease Prevention*, 49.
- Evans, M. D., Dizdaroglu, M., Cooke, M. S. (2004). Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*. 567(1), 1-61.

F

- Fairweather-Tait, S. J. (1997). Bioavailability of selenium. *European Journal of Clinical Nutrition*. 51, 20–23.
- Falleh, H., Ksouri, R., Chaieb, K., Karray-Bouraoui, N., Trabelsi, N., Boulaaba, M., Abdelly, C. (2008). Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *Comptes Rendus Biologies*. 331(5), 372-379.
- Favier, A. (2003). Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*. 5,108-115.
- Favrot, C., Beal, D., Blouin, E., Leccia, MT., Roussel, AM., Rachidi, W. (2018). Age-Dependent Protective Effect of Selenium against UVA Irradiation in Primary Human Keratinocytes and the Associated DNA Repair Signature. *Oxidative medicine and cellular longevity* <https://doi.org/10.1155/2018/5895439>.
- Fecka, I., Turek, S. (2008). Determination of polyphenolic compounds in commercial herbal drugs and spices from Lamiaceae: *Thyme*, wild thyme and sweet marjoram by chromatographic techniques. *Food Chemistry*.108(3), 1039-1053.

- Fenner, K., Canonica, S., Wackett, LP., Elsner, M. (2013). Evaluating pesticide degradation in the environment: Blind spots and emerging opportunities *Science*. 341, 752–758.
- Ferreria, A., Proenca, C., Serralheiro, M.L.M., Araujo, M.E.M. (2006). The in vitro screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of medicinal plant from Portugal. *Journal of ethnopharmacology*.108, 31-37.
- Floche, L., Gunzler, WA. (1984) Analysis of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol*. 105,114-121.
- Fordyce, F. M. (2013). Selenium deficiency and toxicity in the environment. In *Essentials of medical geology* (pp. 375-416). Springer, Dordrecht.
- Fusco, D., Colloca, G., Monaco, M. R. L., et Cesari, M. (2007). Effects of antioxidant supplementation on the aging process. *Clinical interventions in aging*. 2(3), 377.

G

- Galle, J. (2001). Oxidative stress in chronic renal failure. *Nephrology Dialysis Transplantation*.16(11), 2135-2137.
- Ganguli, A., Choudhury, D., Chakrabarti, G. (2014). 2, 4-Dichlorophenoxyacetic acid induced toxicity in lung cells by disruption of the tubulin-microtubule network. *Toxicology Research*.3(2), 118-130.
- Ganther, HE. Selenium metabolism, selenoproteins and mechanisms of cancer prevention: complexities with thioredoxin reductase. *Carcinogenesis*. 2014 ; 20(19) :1657- 66.
- Gaston, E. (2016). Les polyphénols du vin rouge : des propriétés pour prévenir les cancers. Thèse Pour L'obtention du diplôme d'état de docteur en pharmacie. Université de Bordeaux. HAL Id : dumas-01267044.
- Goetz, P., and Ghedira, K. (2012). Mécanisme d'action antibactérienne des huiles essentielles. *Phytothérapie anti-infectieuse*.193-208.
- Gorzinski, S. J., Kociba, R. J., Campbell, R. A., Smith, F. A., Nolan, R. J., Eisenbrandt, D. L. (1987). Acute, Pharmacokinetic, and Subchronic Toxicological Studies of 2, 4-Dichlorophenoxyacetic Acid. *Toxicological Sciences*. 9(3), 423-435.
- Gredilla, R. (2011). DNA damage and base excision repair in mitochondria and their role in aging. *Journal of aging research*.2011.
- Grube, A., Donaldson. D., Kiely, T., Wu, L., Kiely, T. (2011). Pesticides Industry Sales and Usage: 2006 and 2007 Market Estimates. U.S. Environmental Protection Agency 1-41

https://doi.org/https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-10/documents/market_estimates2007.pdf.

- Grunwald, J., Christof, J.M. (2004). Guide de la phytothérapie. La thérapeutique par les plantes. La santé par les plantes. Un répertoire des plantes. Des conseils pratiques. 1^{ère} édition. Marabout: Italie. 360-361.
- Gülcin, I. (2012). Antioxidant activity of food constituents: an overview. Archives of toxicology. 86(3), 345-391.
- Guo, C., Li, X., Wang, R., Yu, J., Ye, M., Mao, L., ... and Zheng, S. (2016). Association between oxidative DNA damage and risk of colorectal cancer: sensitive determination of urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine by UPLC-MS/MS analysis. Scientific reports. 6, 32581.

H

- Habig, WH., Pabst, MJ., Jakoby, WB. (1974). Glutathione S-transferases the first enzymatic step in mercapturic acid formation. Biol Chem. 249(22),7130-7139.
- Haleng, J., Pincemail, J., Defraigne, J. O., Charlier, C.,Chapelle, J. P. (2007). Le stress oxydant. Revue médicale de Liège.62(10), 628-38.
- Halliwell B. (1994). Free radicals and antioxidants: A personal view. Nutrition Reviews. 52 : 253-265.
- Halliwell, B. (1997). Antioxidants and human disease: à general introduction. Nutrition Reviews. 55 : 44–52.
- Halliwell, B., Gutteridge, J. M. (2015). Free radicals in biology and medicine. Oxford University Press, USA.
- Halliwell B. (1994). Free radicals and antioxidants: A personal view. Nutrition Reviews. 52 : 253-265.
- Hans, W. K. (2007). 1000 plantes aromatiques et médicinales. Terre édition, 6-7.
- Hatfield, DL., Tsuji, PA., Carlson, BA., Gladyshev, VN. (2014). Selenium and selenocysteine: roles in cancer, health, and development. Trends in biochemical sciences. 39(3), 112-120.
- Hazzit, M., Baaliouamer, A., Faleiro, M. L., Miguel, M. G. (2006). Composition of the essential oils of Thymus and Origanum species from Algeria and their antioxidant and antimicrobial activities. Journal of agricultural and food chemistry. 54(17), 6314-6321.

- Hazzit, M., Baaliouamer, A., Veríssimo, A. R., Faleiro, M. L., and Miguel, M. G. (2009). Chemical composition and biological activities of Algerian *Thymus* oils. *Food chemistry*. 116(3), 714-721.
- Hegazy, A. M., Abdel-Azeem, A. S., Zeidan, H. M., Ibrahim, K., Sayed, E. E. (2018). Hypolipidemic and hepatoprotective activities of rosemary and thyme in gentamicin-treated rats. *Human & experimental toxicology*. 37(4), 420-430.
- Heimler, D., Vignolini P., Din M.G., Vinueri F.F., Ronani A. (2006). Antiradical activity and polyphenol composition of local Brassicaceae edible varieties. *Food Chemistry*. 99,464-469.
- Hernández, A. F., Lacasaña, M., Gil, F., Rodríguez-Barranco, M., Pla, A., López-Guarnido, O. (2013). Evaluation of pesticide-induced oxidative stress from a gene–environment interaction perspective. *Toxicology*. 307, 95-102.
- Hodek, P., Trefil, P., Stiborová, M. (2002). Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450. *Chemico-biological interactions*.139(1), 1-21.
- Horwath, A. B., Grayer, R. J., Keith-Lucas, D. M., Simmonds, M. S. (2008). Chemical characterisation of wild populations of *Thymus* from different climatic regions in southeast Spain. *Biochemical Systematics and Ecology*. 36(2), 117-133.
- Hossain, M.B., Rai, D.K., Brunton, N.P., Martin-Diana, A.B., Barry-Ryan, C. (2010). Characterization of Phenolic Composition in Lamiaceae Spices by LC-ESI-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 58(19) ,10576-10581.
- Hould, R. (1984). *Techniques d'histopathologie et de cytopathologie*. Ed Maloine .19(21) ,225-227.
- HSDB. (2005)."Hazardous Substances Data Bank. "from <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB>.
- Hu, B., Deng, L., Wen, C., Yang, X., Pei, P., Xie, Y., Luo, S. (2012). Cloning, identification and functional characterization of a pi-class glutathione-S-transferase from the freshwater mussel *Cristaria plicata*. *Fish & shellfish immunology*. 32(1), 51-60.

I

Islam, F., Wang, J, Farooq, MA., Khan, MS., Xu, L., Zhu, J., Zhou, W. (2018). Potential impact of the herbicide 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid on human and ecosystems. *Environment international*. 111,332-351.

Ismail, S. M. (2013). Protective effects of vitamin C against biochemical toxicity induced by malathion pesticides in male albino rat. *Journal of Evolutionary Biology Research*.5(1), 1-5.

J

Jayakody, N., Harris, E. C., Coggon, D. (2015). Phenoxy herbicides, soft-tissue sarcoma and non-Hodgkin lymphoma: a systematic review of evidence from cohort and case-control studies. *British medical bulletin*. 114(1), 75-94.

Jayaraj, R., Megha, P., Sreedev, P. (2016). Organochlorine pesticides, their toxic effects on living organisms and their fate in the environment. *Interdisciplinary toxicology*. 9(3-4), 90-100.

Johansson, L., Gafvelin, G., Arnér, E. S. (2005). Selenocysteine in proteins—properties and biotechnological use. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1726(1), 1-13.

Jollow, DJ., Mitchell JR., Zampaglione, Z., Gillette, JR. (1974). Bromobenzene induced liver necrosis. Protective role of glutathione and evidence for 3,4-bromobenzene oxide as the hepatotoxic metabolites. *Pharmacology*. 11, 51-57.

Joshi, Y. B., Praticò, D. (2012). Vitamin E in aging, dementia, and Alzheimer's disease. *Biofactors*.38(2), 90-97.

K

Kabouche, Z., Boutaghane, N., Laggoune, S., Kabouche, A., Ait-Kaki, Z., Benlabed, K. (2005). Comparative antibacterial activity of five Lamiaceae essential oils from Algeria. *International Journal of Aromatherapy*. 15(3), 129-133.

Kadeche, L., Bourogaa, E., Saoudi, M., Boumendjel, A., Djeflal, A., El feki, A. A. H., Messarah, M. (2017). Ameliorative effects of vanillin against metribuzin-induced oxidative stress and toxicity in rats. *Int J Pharm Pharm Sci*. 9(1), 56-62.

Kalab, T., Skladal, P. (1997) Disposable multichannel immunosensors for 2,4-dichlorophenoxyacetic acid using acetylcholinesterase as an enzyme label. *Electroanalysis*. 9,293–297.

- Karam, Z., Tuazon, J. (2013). Anatomic and physiologic changes of the aging kidney. *Clinics in geriatric medicine*. 29(3), 555-564.
- Ribéreau-Gayon, P. (1968). *Les composés phénoliques des végétaux*.
- Khadri, A., Serralheiro, M. L. M., Nogueira, J. M. F., Neffati, M., Smiti, S., Araújo, M. E. M. (2008). Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of essential oils from *Cymbopogon schoenanthus* L. Spreng. Determination of chemical composition by GC–mass spectrometry and ¹³C NMR. *Food chemistry*, 109(3), 630-637.
- Kholkhal, F. (2014). *Etude phytochimique et activité antioxydante des extraits des composés phénoliques de *Thymus ciliatus ssp coloratus* et *ssp euciliatus** (Doctoral dissertation).
- Kholkhal, F., Lazouni, H. A., Bendahou, M., Boublenza, I., Chabane, S. D., Chaouch, T. (2013). Étude phytochimique et évaluation de l'activité anti-oxydante de *Thymus Ciliatus ssp. Coloratus*. *Afrique Science : Revue Internationale des Sciences et Technologie*. 9(1), 151-158.
- Kim, K. H., Kabir, E., Jahan, S. A. (2017). Exposure to pesticides and the associated human health effects. *Science of the Total Environment*. 575, 525-535.
- Koutros, S., Silverman, D. T., Alavanja, M. C., Andreotti, G., Lerro, C. C., Heltshe, S., ... and Beane Freeman, L. E. (2015). Occupational exposure to pesticides and bladder cancer risk. *International journal of epidemiology*. 45(3), 792-805.
- Kubola, J., Siriamornpun, S. (2008). Phenolic contents and antioxidant activities of bitter gourd (*Momordica charantia* L.) leaf, stem and fruit fraction extracts in vitro. *Food chemistry*. 110(4), 881-890.
- Kulusic, T., Dragovic-Uzelac, V., Milos, M. (2006). Antioxidant activity of aqueous tea infusions prepared from oregano, thyme and wild thyme. *Food Technology and Biotechnology*. 44(4): 485-492.
- Kumar, S., et al., 2017. Impact of spatial and climatic conditions on phytochemical diversity and in vitro antioxidant activity of Indian Aloe vera (L.) Burm.f. *South African journal of botany*. 111, 50–59.
- Kurutas, E. B. (2015). The importance of antioxidants which play the role in cellular response against oxidative/nitrosative stress: current state. *Nutrition journal*. 15(1), 71.

L

- Laukkanen, M. O. (2016). Extracellular superoxide dismutase: growth promoter or tumor suppressor? *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2016.
- Lebreton, P., Salat, O., Nicol, J. M. (1998). Un point sur le sélénium. *Bull. Tech. GTV*, 35-47.
- Lee, I. C., Bae, J. S., Kim, T., Kwon, O. J., Kim, T. H. (2011). Polyphenolic constituents from the aerial parts of *Thymus quinquecostatus* var. *japonica* collected on Ulleung Island. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*.54(5), 811-816.
- Lerro, C. C., Beane Freeman, L. E., Portengen, L., Kang, D., Lee, K., Blair, A., ... and Vermeulen, R. C. (2017). A longitudinal study of atrazine and 2, 4-D exposure and oxidative stress markers among iowa corn farmers. *Environmental and molecular mutagenesis*, 58(1).30-38.
- Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, et al. (1990). Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol*. 186,464-78.
- Li, H.B., Cheng, K.W., Wong, C.C., Fan, K.W., Chen, F., Jiang, Y., Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food chemist*. 102 (2007). 771-776.
- Lima, J. E., Xavier, D. J., Sakamoto-Hojo, E. T. (2019). Oxidative Stress, DNA Damage and Repair Pathways in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. In *Type 2 Diabetes*. Intech Open.
- Liu, H., Xu, H., Huang K. (2017). Selenium in the prevention of atherosclerosis and its underlying mechanisms. *Metallomics*. 9,21-37.
- Liu, W., Li, H., Tao, F., Li, S., Tian, Z., Xie, H. (2013). Formation and contamination of PCDD/Fs, PCBs, PeCBz, HxCBz and polychlorophenols in the production of 2, 4-D products. *Chemosphere*.92(3), 304-308.
- Liyana-Pathirana, C.M., t Shahidi, F. Antioxydant propreties of commercial soft and hard winter wheats (*Triticum aestivium* L.) and their milling fractions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 86 (2006) ,477-485.
- Lopes-Lutz, D., S. Alviano, D., S. Alviano, C., P. Kolodziejczyk, P. 2008. Screening of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Artemisia* essential oils. *Phytochemistry*. 69 :1732-1738.

Loscalzo, J. (2014). Keshan disease, selenium deficiency, and the selenoproteome. *New England Journal of Medicine*.370(18), 1756-1760.

Łuczaj, W., Gęgotek, A., Skrzydlewska, E. (2017). Antioxidants and HNE in redox homeostasis. *Free Radical Biology and Medicine*.111, 87-101.

Lushchak, V. I., Matviishyn, T. M., Husak, V. V., Storey, J. M., Storey, K. B. (2018). Pesticide toxicity: a mechanistic approach. *EXCLI journal*.17, 1101.

M

Maataoui, B.S., Hmyene, A., Hilali, S. 2006. Activités anti-radicalaires d'extraits de jus de fruits du figuier de barbarie (*Opuntia ficus indica*). *Lebanese Science Journal*.7(1):3-8.

Madrigal-Bujaidar, E., Hernandez-Ceruelos, A., Chamorro, G. (2001). Induction of sister chromatid exchanges by 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid in somatic and germ cells of mice exposed in vivo. *Food and Chemical Toxicology*. 39(9), 941-946.

Maire, M. A., Rast, C., Landkocz, Y., Vasseur, P. (2007). 2, 4-Dichlorophenoxyacetic acid: effects on Syrian hamster embryo (SHE) cell transformation, c-Myc expression, DNA damage and apoptosis. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*.631(2), 124-136.

Mansour, SA., Mohamed RI., Ali, AR. (2017). Ameliorating effect of selenium against deltamethrin induced hepato-renal dysfunction and oxidative stress to pregnant rats and their offspring. *Journal of Toxicology and Pharmacology*.1(002).

Marin, P.D., Grayer, R.J., Kite, G.C., Veljic, M. (2005). External flavones from *Thymus striatus Vahl* (Lamiaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*. 33(11),1179-1182. In: Pereira, O.R., Cardoso, S.M. (2013).

Marklund, S. L. (1982). Human copper-containing superoxide dismutase of high molecular weight. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 79(24), 7634-7638.

Maronpot, RR., Yoshizawa K., Nyska, A., Harada, T., Flake, G., Mueller, G., Ward, JM. (2010). Hepatic enzyme induction: histopathology. *Toxicologic pathology*. 38(5), 776-795.

Marreiro, D., Cruz, K., Morais, J., Beserra, J., Severo, J., de Oliveira, A. (2017). Zinc and oxidative stress: current mechanisms. *Antioxidants*. 6(2), 24.

Mehdi, Y., Hornick, J.-L., Istasse, L., Dufrasne, I. (2013). Selenium in the Environment, Metabolism and Involvement in Body Functions. *Molecules*. 18(3), 3292–3311. [doi :10.3390/molecules18033292](https://doi.org/10.3390/molecules18033292).

- Mehra, B., Sharma, P., Kaushik, U., Joshi, S. (2014). Effect of fytolan on haematology and serum parameters of male albino rats. *World Journal of Pharmaceutical Sciences*. 3, 817-829.
- Meng, X., Li, Y., Li, S., Gan, R. Y., Li, H. B. (2018). Natural Products for Prevention and Treatment of Chemical-Induced Liver Injuries. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*.17(2), 472-495.
- Messarah, M., Klibet, F., Boumendjel, A., Abdennour, C., Bouzerna, N., Boulakoud, M. S., El Feki A. (2012). Hepatoprotective role and antioxidant capacity of selenium on arsenic-induced liver injury in rats. *Experimental and toxicologic pathology*. 64(3),167-174.
- Miara, M. D., Bendif, H., Ouabed, A., Rebbas, K., Hammou, M. A., Amirat, M., ... and Teixidor-Toneu, I. (2019). Ethnoveterinary remedies used in the Algerian steppe: Exploring the relationship with traditional human herbal medicine. *Journal of ethnopharmacology*. 244, 112164.
- Migdal, C., and Serres, M. (2011). Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant. *Médecine/sciences*. 27(4), 405-412.
- Miller, R. E., McConville, M. J., and Woodrow, I. E. (2006). Cyanogenic glycosides from the rare Australian endemic rainforest tree *Clerodendrum grayi* (Lamiaceae). *Phytochemistry*. 67(1), 43-51.
- Millet-Boureima, C., Porras Marroquin, J., Gamberi, C. (2018). Modeling Renal Disease “On the Fly”. *BioMed research international*.
- Motohashi, N., Gallagher, R., Anuradha, V., Gollapudi, R. (2017). Co-enzyme Q10 (Ubiquinone): It's Implication in Improving the Life Style of the Elderly. *Med Clin Rev*. 3(S1), 10.
- Mountassif, D., Kabine, M., Mounchid K., Mounaji, K., Latruffe, N., El Kebbaj, M.H.S. (2008) Biochemical and histological alterations of cellular metabolism from jerboa (*Jaculus orientalis*) by 2, 4-Dichlorophenoxyacetic acid: Effects on D-3-hydroxybutyrate dehydrogenase. *Pesticide biochemistry and physiology*. 90(2),87-96.
- Mukinda, J. T., Syce, J. A. (2007). Acute and chronic toxicity of the aqueous extract of *Artemisia afra* in rodents. *Journal of ethnopharmacology*. 112(1), 138-144.
- Murray., Bender. ,Bothan., Kennlly., Rodwell., wiel. (2013). *Biochimie de Harper* 5 édition. De Boech supérieure s.a Paris ; p, 561.

N

- Naghibi F., Mosaddegh M., Mohammadi M.S. et Ghorbani A. (2005). Labiatae Family infolk Medicine in Iran: from Ethnobotany to Pharmacology-Iranian journal of harmaceuticalresearch. 2, 63-79.
- Nakbi, A., Tayeb, W., Dabbou, S., Chargui, I., Issaoui, M., Zakhama, A., Miled, A., Hammami, M. (2012). Hypolipidemic and antioxidant activities of virgin olive oil and its fractions in 2,4-diclorophenoxyacetic acid-treated rats. Nutrition. 28,81-91.
- Nakbi, A., Tayeb, W., Grissa, A., Issaoui, M., Dabbou, S., Chargui, I., Ellouz, M., Miled, A., Hammami, M. (2010). Effects of olive oil and its fractions on oxidative stress and the liver's fatty acid composition in 2, 4-Dichlorophenoxyacetic acid-treated rats. Nutrition & metabolism .7(1), 80.
- Nakbi, A., Tayeb, W., Dabbou, S., Chargui, I., Issaoui, M., Ferih, A., ... and Hammami, M. (2012). Olive oil protects against 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid-induced oxidative renal dysfunction in adult rats. European journal of lipid science and technology. 114(4), 469-478.
- Navarro-Alarcon, M., Cabrera-Vique, C. (2008). Selenium in food and the human body: a review. Science of the total environment. 400(1-3), 115-141.
- Neumeister, L. (2014). The risks of the herbicide 2, 4-D. Munich: Technobiosafety.
- Nickavar, B., Mojab, F., and Dolat-Abadi, R. (2005). Analysis of the essential oils of two *Thymus* species from Iran. Food chemistry. 90(4), 609-611.
- Nissar, S., Sameer, A. S., Rasool, R., Chowdri, N. A., Rashid, F. (2017). Glutathione S transferases: Biochemistry, polymorphism and role in colorectal carcinogenesis. J. Carcinog. Mutagen. 8(2), 287.
- Nunomura, A., Honda, K., Takeda, A., Hirai, K., Zhu, X., Smith, MA., Perry, G. (2006). Oxidative damage to RNA in neurodegenerative diseases. J Biomed Biotechno.l, 1–6.

O

- Oduola, T., Bello, I., Adeosun, G., Ademosun, A. W., Raheem, G., Avwioro, G. (2010). Hepatototoxicity and nephrotoxicity evaluation in Wistar albino rats exposed to *Morinda lucida* leaf extract. North American journal of medical sciences. 2(5), 230.

- Oliveira, I., Sousa, A., Ferreira, I. C., Bento, A., Estevinho, L., Pereira, J. A. (2008). Total phenols, antioxidant potential and antimicrobial activity of walnut (*Juglans regia* L.) green husks. *Food and chemical toxicology*. 46(7), 2326-2331.
- OMS. Genève (1970). Evaluations of some pesticide's residues in food.
- OMS. (2003). 2,4-D in drinking-water. background document for development of WH guidelines for drinking-water quality. prepared by Dr P. Toft, Canada
- Oyededeji, O., Oziegbe, M., Taiwo, F. O. (2011). Antibacterial, antifungal and phytochemical analysis of crude extracts from the leaves of *Ludwigia abyssinica* A. Rich. and *Ludwigia decurrens* Walter. *Journal of Medicinal Plants Research*. 5(7), 1192-1199.
- Ozcan, T., Akpinar-Bayazit, A., Yilmaz-Ersan, L., Delikanli, B. (2014). Phenolics in human health. *International Journal of chemical engineering and applications*. 5(5), 393.

P

- Pacifico, S., Piccolella, S., Papale, F., Nocera, P., Lettieri, A., Catauro, M. (2016). A polyphenol complex from *Thymus vulgaris* L. plants cultivated in the Campania Region (Italy): New perspectives against neuroblastoma. *Journal of Functional Foods*. 20, 253-266.
- Pan, Y., Wang, K., Huang, S., Wang, H., Mu, X., He, C., ... and Huang, F. (2008). Antioxidant activity of microwave-assisted extract of longan (*Dimocarpus Longan* Lour.) peel. *Food Chemistry*. 106(3), 1264-1270.
- Papp, LV., Holmgren, A., Khanna, KK. (2010). Selenium and selenoproteins in health and disease. *Antioxidants & redox signaling*. 12(7),793-795.
- Petersen, M., Simmonds, M.S.J. (2003). Molecules of Interest, Rosmarinic acid. *Phytochemistry*. 62: 121-125.
- Peterson, MA., McMaster, SA., Riechers, DE., Skelton, J., Stahlman, PW. (2016). 2,4-D past, present, and future: a review. *Weed Technology*. 30(2),303–345.
- Pham-Huy, L. A., He, H., Pham-Huy, C. (2008). Free radicals, antioxidants in disease and health. *International journal of biomedical science: IJBS*. 4(2), 89.
- Phaniendra, A., Jestadi, D. B., Periyasamy, L. (2015). Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian journal of clinical biochemistry* 30(1), 11-26.
- Piquet, M. A., Hébuterne, X. (2007). *Nutrition en pathologie digestive*. Doin.

- Pisoschi, AM., Pop, A. (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 97, 55-74.
- Pizzino, G., Irrera, N., Cucinotta, M., Pallio, G., Mannino, F., Arcoraci, V., ... and Bitto, A. (2017). Oxidative stress: harms and benefits for human health. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2017.
- Powers, S. K., Jackson, M. J. (2008). Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiological reviews*. 88(4), 1243-1276.
- Prakash, D., Upadhyay, G., Gupta, C., Pushpangadan, P., Singh, K. K. (2012). Antioxidant and free radical scavenging activities of some promising wild edible fruits. *International Food Research Journal*. 19(3), 1109.
- Puttanna, G. S., Nayak, S., Ravi, M., Ravishankar, B. (2016). Nephroprotective activity of *Amomum subulatum* seeds against cypermethrin induced nephrotoxicity in rats. *The Journal of Phytopharmacology*. 5(4): 145-149

Q

- Quezel, P., Santa, S. (1963). *Nouvelle flore de l. Algérie et des régions désertiques méridionales (New Flora of Algeria and the Southern Desert Regions).* (Editions CNRS : Paris.).
- Quinzii, C. M., DiMauro, S., Hirano, M. (2007). Human coenzyme Q 10 deficiency. *Neurochemical research*. 32(4-5), 723-727.

R

- Rahman, K. (2007). Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clinical interventions in aging*. 2(2), 219.
- Rajagopal, P. L., Premaletha, K., Kiron, S., Sreejith, K. A. (2013). A review on Nephroprotective herbs and herbal formulations. *International Journal of Pharmaceutical and Chemical Sciences*. 2(4), 1888-1904.
- Raanan, R., Harley, K. G., Balmes, J. R., Bradman, A., Lipsett, M., Eskenazi, B. (2014). Early-life exposure to organophosphate pesticides and pediatric respiratory symptoms in the CHAMACOS cohort. *Environmental health perspectives*, 123(2), 179-185.
- Rayman, M. (2017). Selenium Intake and Status in Health & Disease. *Free Radical Biology and Medicine*. 112, 5.

- Reeg, S., Grune, T. (2015). Protein oxidation in aging: does it play a role in aging progression? *Antioxidants & redox signaling*. 23(3), 239-255.
- Regoli, F., Winston, G. W. (1999). Quantification of total oxidant scavenging capacity of antioxidants for peroxynitrite, peroxy radicals, and hydroxyl radicals. *Toxicology and applied pharmacology*. 156(2), 96-105.
- Reilly, C. (2006). The biology of selenium. *Selenium in Food and Health*. 20-42.
- Revathy, K. S., Umasuthan, N., Lee, Y., Choi, C. Y., Whang, I., Lee, J. (2012). First molluscan theta-class Glutathione S-Transferase: Identification, cloning, characterization and transcriptional analysis post immune challenges. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. 162(1-3), 10-23.
- Rjeibi, I., Ben Saad, A., and Hfaiedh, N. (2016). Oxidative damage and hepatotoxicity associated with deltamethrin in rats: the protective effects of *Amaranthus spinosus* seed extract. *Biomedicine and pharmacotherapy*. 84, 853–860.
- Roman, M., Jitaru, P., Barbante, C. (2014). Selenium biochemistry and its role for human health. *Metallomics*. 6(1), 25-54.
- Roussel, A. M., Hininger-Favier, I. (2009). Éléments-trace essentiels en nutrition humaine : chrome, sélénium, zinc et fer. *Endocrinologie Nutrition*. 10.
- Bubió, L., Serra, A., Macià, A., Borràs, X., Romero, M.P., Motilva, M.J. (2012). Validation of determination of plasma metabolites derived from thyme bioactive compounds by improved liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*. 905 : 75-84.
- Ruseva, B., Atanasova, M., Tsvetkova, R., Betova, T., Mollova, M., Alexandrova, M., Laleva, P., Dimitrova, A. (2015). Effect of selenium supplementation on redox status of the aortic wall in young spontaneously hypertensive rats. *Oxidative medicine and cellular longevity* <https://doi.org/10.1155/2015/609053>

S

- Sadou, N., Seridi, R., Hamel, T. (2016). Chemical Composition and Antioxidant Activity of Essential Oils of *Thymus ciliatus ssp. coloratus* from Annaba-Algeria. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* 35, 180-185.

- Samuel, O.L., St-Laurent, B., Gingras and M. Valcke. (2006). Profil toxicologique du 2,4-D et risque à la santé associée à l'utilisation de l'herbicide en milieu urbain. Groupe scientifique sur les pesticides. Institut national de santé publique. Québec.
- Santé Canada. (2008). Décision de réévaluation : Acide (2,4-dichlorophénoxy) acétique [2,4-D]. Document de réévaluation RVD2008-11. Ministre de la Santé, Ottawa (Ontario). www.hc-sc.gc.ca/cps-spc/pubs/pest/decisions/rvd2008-11/index-fra.php
- Sastry, BVR., Janson, VE., Clark, CP., Owens, LK. (1997). Cellular toxicity of 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid; formation of 2,4,5-trichlorophenoxyacetylcholine. *Cell Mol Biol.* 43,549–557
- Schrauzer, G. N. (2000). Selenomethionine: a review of its nutritional significance, metabolism and toxicity. *The Journal of nutrition.* 130(7), 1653-1656.
- Sellers, R S., Mortan, D., Michael, B., Roome, N., Johnson, JK., Yano, BL., Perry, R., Schafer, K. (2007). Society of Toxicologic Pathology position paper: organ weight recommendations for toxicology studies. *Toxicologic pathology.* 35(5),751-755.
- Senoglu, M., Nacitarhan, V., Kurutas, E. B., Senoglu, N., Altun, I., Atli, Y., Ozbag, D. (2009). Intraperitoneal Alpha-Lipoic Acid to prevent neural damage after crush injury to the rat sciatic nerve. *Journal of brachial plexus and peripheral nerve injury.*4(1), 22.
- Shafeeq, S., Mahboob, T. (2019). Magnesium supplementation ameliorates toxic effects of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid in rat model. *Human and experimental toxicology,* 0960327119874428.
- Shahidi, F., Yeo, J. (2018). Bioactivities of phenolics by focusing on suppression of chronic diseases: A review. *International journal of molecular sciences.* 19(6), 1573.
- Sharma, P., Sharma, A., Jasuja, ND., Joshi SC. (2014) Organophosphorus compounds and oxidative stress: a review. *Toxicological & Environmental Chemistry.* 96(5),681-698.
- Simonoff, M., Simonoff, G. (1991). *Le sélénium et la vie.* Centre National de la Recherche Scientifique. Masson. Paris. 242.
- Singh, M., Kapoor, A., Bhatnagar, A. (2015). Oxidative and reductive metabolism of lipid-peroxidation derived carbonyls. *Chemico-biological interactions.* 234, 261-273.
- Sofiane, G., Wafa, N., Abbas, K., Amar, O. (2015). Antioxidant and antimicrobial activities of flavonoids extracted from *Thymus ciliatus (Desf.) Benth.* *Der Pharmacia Lettre.*7(7), 358-63.

- Song, Y. (2014). Insight into the mode of action of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D) as an herbicide. *Journal of integrative plant biology*. 56(2), 106-113.
- Speckmann, B., Grune, T. (2015). Epigenetic effects of selenium and their implications for health. *Epigenetics*.10(3), 179-190.
- Stadtman, E. R., Levine, R. L. (2003). Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino acids*. 25(3-4), 207-218.
- Steinbrenner, H., Sies, H. (2013). Selenium homeostasis and antioxidant selenoproteins in brain: implications for disorders in the central nervous system. *Archives of biochemistry and biophysics*. 536(2), 152-157.
- Stelmach, I., Grzelewski, T., Bobrowska-Korzeniowska, M., Kopka, M., Majak, P., Jerzynska, J., ... and Wąsowicz, W. (2014, May). The role of zinc, copper, plasma glutathione peroxidase enzyme, and vitamins in the development of allergic diseases in early childhood: The Polish mother and child cohort study. In *Allergy & Asthma Proceedings*.35(3).
- Stephen, A. O., James, O., Ikoojo, E. R., Sunday, A. O. (2016). Effects of selenium treatment on healing of acetic acid induced gastric ulcer in albino Wistar rats. *American Journal of Biomedical Research*. 4(1), 18-22.
- Subramaniam, K., Solomon, J. (2006). Organochlorine pesticides BHC and DDE in human blood in and around Madurai, India. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*. 21(2), 169.
- Suckow, M. A., Stevens, K. A., Wilson, R. P. (Eds.). (2012). *The laboratory rabbit, guinea pig, hamster, and other rodents*. Academic Press.
- Suzuki, K. T., Doi, C., Suzuki, N. (2006). Metabolism of ⁷⁶Se-methylselenocysteine compared with that of ⁷⁷Se-selenomethionine and ⁸²Se-selenite. *Toxicology and applied pharmacology*. 217(2), 185-195.
- Suzuki, K. T., Kurasaki, K., Ogawa, S., Suzuki, N. (2006b). Metabolic transformation of methylseleninic acid through key selenium intermediate selenide. *Toxicology and applied pharmacology*.215(2), 189-197.
- Suzuki, K. T., Tsuji, Y., Ohta, Y., Suzuki, N. (2008). Preferential organ distribution of methylselenol source Se-methylselenocysteine relative to methylseleninic acid. *Toxicology and applied pharmacology*. 227(1), 76-83.

Suzuki, Y., Hashiura, Y., Matsumura, K., Matsukawa, T., Shinohara, A., Furuta, N. (2010). Dynamic pathways of selenium metabolism and excretion in mice under different selenium nutritional statuses. *Metallomics*. 2(2), 126-132.

T

Tadeo, J. L. (2008). Analysis of pesticides in food and environmental samples. CRC Press.

Tan, B. L., Norhaizan, M. E., Winnie-Pui-Pui Liew, H. S. (2018). Antioxidant and oxidative stress: A mutual interplay in age-related diseases. *Frontiers in pharmacology*.9.

Tanner, C. M., Ross, G. W., Jewell, S. A., Hauser, R. A., Jankovic, J., Factor, S. A., ... & Bhudhikanok, G. S. (2009). Occupation and risk of parkinsonism: a multicenter case-control study. *Archives of neurology*, 66(9), 1106-1113.

Tayeb, W., Nakbi A., Cheraief, I., Miled, A., Hammami, M. (2013). Alteration of lipid status and lipid metabolism, induction of oxidative stress and lipid peroxidation by 2, 4-dichlorophenoxyacetic herbicide in rat liver. *Toxicology mechanisms and methods*. 23(6), 449-458.

Tayeb, W., Nakbi, A., Trabelsi, M., Attia, N., Miled, A., Hammami, M. (2010). Hepatotoxicity induced by sub-acute exposure of rats to 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid based herbicide "Désormone lourde." *Journal of Hazardous Materials*. 180(1-3,225–233.

Tayeb, W., Nakbi, A., Trabelsi, M., Miled, A., Hammami, M. (2012). Biochemical and histological evaluation of kidney damage after sub-acute exposure to 2, 4-dichlorophenoxyacetic herbicide in rats: involvement of oxidative stress. *Toxicology mechanisms and methods*.22(9), 696-704.

Tepe, B., Sokmen, M., Akpulat, H. A., Sokmen, A. (2006). Screening of the antioxidant potentials of six *Salvia* species from Turkey. *Food Chemistry*. 95(2), 200-204.

Tefiani, C., Riazi, A., Youcefi, F., Aazza, S., Gago, C., Faleiro, M. L., ... and Cortés-Giraldo, I. (2015). *Ammoides pusilla* (Apiaceae) and *Thymus munbyanus* (Lamiaceae) from Algeria essential oils: chemical composition, antimicrobial, antioxidant and antiproliferative activities. *Journal of Essential Oil Research*.27(2), 131-139.

Thanan, R., Oikawa, S., Hiraku, Y., Ohnishi, S., Ma, N., Pinlaor, S., ... and Murata, M. (2015). Oxidative stress and its significant roles in neurodegenerative diseases and cancer. *International journal of molecular sciences*. 16(1), 193-217.

- Therond, P., Malvy, D., Favier, A. (1997). Toxicité du sélénium à doses pharmacologiques par voie orale. *Nutrition clinique et métabolisme*. 11(2), 91-101.
- Therond, P. (2006). Oxidative stress and damages to biomolecules (lipids, proteins, DNA). In *Annales pharmaceutiques françaises*. 64(6), 383-389.
- Thierry, M. (2005). *Guide de la flore méditerranéenne de Collioure à Menton. Arrière-pays et littoral*. Editions-Sud-ouest : France. P16.
- Thiry, C., Ruttens, A., De Temmerman, L., Schneider, Y. J., Pussemier, L. (2012). Current knowledge in species-related bioavailability of selenium in food. *Food Chemistry*. 130(4), 767-784.
- Trabut, L. (1935). *Flore du nord de l'Afrique : répertoire des noms indigènes des plantes spontanées, cultivées et utilisées dans le nord de l'Afrique*. Imprimeries. La typo-litho" et J. Carbonel réunies.
- Troudi, A., Soudani, N., Samet, AM., Amara, IB., Zeghal, N. (2011) 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid effects on nephrotoxicity in rats during late pregnancy and early postnatal periods. *Ecotoxicology and environmental safety*. 74(8), 2316-2323.
- Tomlin, C. (1994). *The Pesticides Manual*. 10th Ed. The Bath Press Bath. 271.

U

- Umasuthan, N., Revathy, K. S., Lee, Y., Whang, I., Choi, C. Y., Lee, J. (2012). A novel molluscan sigma-like glutathione S-transferase from Manila clam, *Ruditapes philippinarum*: Cloning, characterization and transcriptional profiling. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 155(4), 539-550.
- Upadhyaya, A. M., Rao, M. V., D jhala, D. (2018). Ameliorative effects of melatonin against 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid toxicity in kidney of mice a histological study. *Asian J Pharm Clin Res*. 11(1), 78-82.
- US EPA: UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (2005b). Toxicity Categories and Pesticide Label Statements. Reregistration Eligibility Decision (RED): 2,4-D. List A, Case 0073. Research
- Uttara, B., Singh, A. V., Zamboni, P., Mahajan, R. T. (2009). Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Current neuropharmacology*. 7(1), 65-74.

Uyanikgil, Y., Ateş, U., Baka, M., Biçer, S., Öztaş, E., Ergen, G. (2009). Immunohistochemical and histopathological evaluation of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid-induced changes in rat kidney cortex. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*. 82(6), 749-755.

V

Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M., Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 39(1), 44-84.

Valko, M., Rhodes, C., Moncol, J., Izakovic, M. M., Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-biological interactions*. 160(1), 1-40.

van Acker, S. A., van Balen, G. P., van den Berg, D. J., Bast, A., van der Vijgh, W. J. (1998). Influence of iron chelation on the antioxidant activity of flavonoids. *Biochemical pharmacology*. 56(8), 935-943.

Vanessa Fiorentino, T., Prioleta, A., Zuo, P., Folli, F. (2013). Hyperglycemia-induced oxidative stress and its role in diabetes mellitus related cardiovascular diseases. *Current pharmaceutical design*. 19(32), 5695-5703.

Van Ravenzwaay, B., Hardwick, T. D., Needham, D., Pethen, S., Lappin, G. J. (2003). Comparative metabolism of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D) in rat and dog. *Xenobiotica*. 33(8), 805-821.

Verschueren, K. (2001). *Handbook of Environmental Data on Organic Chemicals*. New York, NY, Van Nostrand Reinhold Co.

W

Wafa, T., Amel, N., Issam, C., Imed, C., Abdelhedi, M., Mohamed, H. (2011). Subacute effects of 2, 4-dichlorophenoxyacetic herbicide on antioxidant defense system and lipid peroxidation in rat erythrocytes. *Pesticide biochemistry and physiology*. 99(3), 256-264.

Wallace, D. C. (2008). Mitochondria as chi. *Genetics*. 179(2), 727-735.

Wang, N., Tan, HY., Li, S., Xu, Y., Guo, W., Feng, Y. (2017). Supplementation of micronutrient selenium in metabolic diseases: Its role as an antioxidant. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2017 <https://doi.org/10.1155/2017/7478523>

- Weisiger, R. A., Fridovich, I. (1973). Superoxide dismutase organelle specificity. *Journal of Biological Chemistry*.248(10), 3582-3592.
- Weiss, M. F., Erhard, P., Kader-Attia, F. A., Wu, Y. C., Deoreo, P. B., Araki, A., ... and Monnier, V. M. (2000). Mechanisms for the formation of glycoxidation products in end-stage renal disease. *Kidney international*. 57(6), 2571-2585.
- Wrobel, J K., Power, R., Toborek, M. (2016) Biological activity of selenium: revisited. *IUBMB life*. 68(2) ,97-105.

X

- Xia, X., Hua, C., Xue, S., Shi, B., Gui, G., Zhang, D., et al. (2016). Response of selenium dependent glutathione peroxidase in the freshwater bivalve *Anodonta woodiana* exposed to 2,4-dichlorophenol,2,4,6-trichlorophenol and pentachlorophenol. *Fish Shellfish Immunol*. 55, 499-509.

Y

- Yakhlef, G., Laroui, S., Hambaba, L., Aberkane, M. C., Ayachi, A. (2011). Évaluation de l'activité antimicrobienne de *Thymus vulgaris* et de *Laurus nobilis*, plantes utilisées en médecine traditionnelle. *Phytothérapie*. 9(4), 209.
- Yassa, V. F., Girgis, S. M., Abumourad, I. M. (2011). Potential protective effects of vitamin E on diazinon-induced DNA damage and some haematological and biochemical alterations in rats. *Journal of Mediterranean Ecology*. 11, 31-39.
- Yin, H., Xu, L., Porter, N. A. (2011). Free radical lipid peroxidation: mechanisms and analysis. *Chemical reviews*.111(10), 5944-5972.
- Yuet Ping, K., Darah, I., Chen, Y., Sreeramanan, S., Sasidharan, S. (2013). Acute and subchronic toxicity study of *Euphorbia hirta* L. methanol extract in rats. *BioMed research international*. 2013.

Z

- Zeghib, A. (2013). Etude phytochimique et activités antioxydante, antiproliférative, antibactérienne et antivirale d'extraits et d'huiles essentielles de quatre espèces endémiques du genre *Thymus*, Thèse de Doctorat, Université de Constantine1-Algérie.
- Zgórkka, G., Główniak, K. (2001). Variation of free phenolic acids in medicinal plants belonging to the Lamiaceae family. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*.26(1), 79-87.

- Zhang, H., Feng, X., Jiang, C., Li, Q., Liu, Y., Gu, C., ... and Larssen, T. (2014). Understanding the paradox of selenium contamination in mercury mining areas: High soil content and low accumulation in rice. *Environmental pollution*. 188, 27-36.
- Zhou, J., Huang, K., Lei, X G. (2013). Selenium and diabetes—evidence from animal studies. *Free Radical Biology and Medicine*. 65,1548-1556.
- Ziani, B. E., Barros, L., Boumehira, A. Z., Bachari, K., Heleno, S. A., Alves, M. J., Ferreira, I. C. (2018). Profiling polyphenol composition by HPLC-DAD-ESI/MSn and the antibacterial activity of infusion preparations obtained from four medicinal plants. *Food & function*. 9(1),149-159.
- Ziani, B. E., Heleno, S. A., Bachari, K., Dias, M. I., Alves, M. J., Barros, L., Ferreira, I. C. (2019). Phenolic compounds characterization by LC-DAD-ESI/MSn and bioactive properties of *Thymus algeriensis* Boiss. et Reut. et *Ephedra alata* Decne. *Food Research International*. 116, 312-319.

ANNEXES

Annexe

Annexe 1. Composition de l'aliment pour 1 kilogramme de nourriture (ONAB, Bejaïa)

Matière alimentaire	Quantité en g/kg d'aliment	Pourcentage (%)
Mais	620	62
Soja	260	26
Phosphate	16	1.6
Calcaire	9	0.9
Cellulose	10	1.0
Minéraux	10	1.0
Vitamines	10	1.0

Annexe2. Liste des réactifs chimiques spécifiques utilisés.

Réactifs	Nom complet (code)	Firme
Acide ortho-phosphorique 85%	-----	Sigma Aldrich
BHT	Hydroxy toluénebutylé	Sigma Aldrich
Bleu de Coomassie	-----	MERCK
BSA	Bovine Serum Albumine lyophilized	Fluka
DTNB	Acide 5-5'-dithiobis-2-nitro benzoïque	Sigma Aldrich
GSH	Glutathion	Sigma Aldrich
Méthionine	L-Méthionine	Biochem. Chemopharma
NBT	Nitro Blue Tetrazolium	Sigma Aldrich
Riboflavine	-----	Biochem. Chemopharma
TBA	Acide thiobarbiturique	Sigma Aldrich
TCA	Acide trichloracétique	Sigma Aldrich
DPPH	2.2-diphényle-1-picrylhydrazyl	ALDER
Riboflavine	-----	Biochem. Chemopharma
NBT	Nitro Blue Tetrazolium	Sigma Aldrich

Préparation des solutions

1. Dosage des protéines par la méthode de Bradford

BSA (1 mg/ml) :

Dissoudre 5 mg BSA dans 5 ml d'eau distillée.

Réactif de Bradford :

Dissoudre 100 mg de bleu de Coomassie (G 250) dans 50 ml d'éthanol (95%). Agiter par pendant 2 heures, puis ajouter 100 ml d'acide orthophosphorique (85%) et 850 ml d'eau distillée (pour obtenir 1 L de solution). Ce réactif doit être filtré puis conserver pendant 1 mois au maximum à une température de 4°C et à l'abri de la lumière.

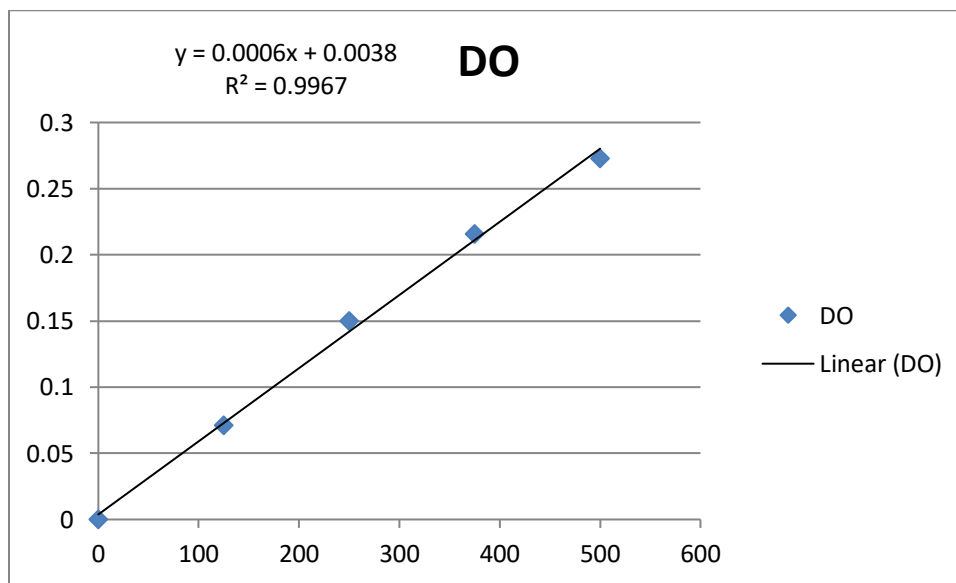


Figure : La gamme d'étalonnage réalisée à partir d'une solution mère de BSA

2. Dosage de MDA

La solution du tampon TBS :

Tris (50mM), NaCl (150mM) : pH 7,4

0,6057g de Tris (50 mM) dans 100 ml de Na Cl (150 mM).

La solution d'H Cl (0,6 M) :

51,569 ml de H Cl 36% dans 1L d'eau.

La solution de Tris - TBA :

0,173g de TBA (120 mM) dans 10ml de Tris (26 mM).

La solution de TCA – BHT :

1g de BHT (Butyl hydroxytoluene) dans 100 ml de TCA (acide trichloracétique) à 20%

3. Dosage du glutathion

Tris (0,4 M), EDTA (0,02 M) : pH 9,6 :

Dissoudre 12,114 g Tris et 1,871 g EDTA dans 250 ml d'eau distillée et ajuster le pH à 9,6.

EDTA (0,02 M) :

Dissoudre 5,613 g EDTA dans 750 ml d'eau distillée.

DTNB (0,01 M) :

Dissoudre 200 mg DTNB dans 50 ml de méthanol absolu.

L'acide salicylique (0,25%) :

Dissoudre 250 mg d'acide salicylique dans 100 ml d'eau distillée.

4. Dosage du taux des protéines carbonylées

La solution de DNPH :

4.5 mg de DNPH dans 1 ml de HCl (2N).

La solution du HCl (2N):

Pour préparer une solution de 2N, il faut ajouter 24 ml d'eau distillée à 4 ml de HCl (12N).

La solution de TCA (20 %) :

20 mg de TCA dans 100 ml d'eau distillée

Ethanol : éthyl acétate :

(1v :1v)

La solution de Guanidine-HCl (6M) :

573,216 g/litre

5. Dosage de l'activité enzymatique de la glutathion peroxydase (GPx)

GSH (0.1 mM) : Dissoudre 3,073 mg GSH dans 100 ml d'eau distillée.

TCA (1%) : Dissoudre 1 g TCA dans 100 ml d'eau distillée.

DTNB (1,0 mM) : Dissoudre 100 mg DTNB dans 250 ml de méthanol absolu.

6. Dosage de l'activité enzymatique de la catalase (CAT)

Tampon phosphate (0.1 M, pH 7.4) :

Solution A, dissoudre 6,24 g NaH_2PO_4 (2 H_2O) dans 200 ml d'eau distillée.

Solution B, dissoudre 14,32 g Na_2HPO_4 (12 H_2O) dans 200 ml d'eau distillée.

Mélanger 16 ml de la solution A avec 84 ml de la solution B

7. Dosage de l'activité enzymatique de la superoxyde dismutase (SOD)

Le tampon phosphate (50 mM), PH = 7, 8 :

Na_2HPO_4 : 4,476g, NaH_2PO_4 : 1,95g : dans 250ml d'eau distillée

La solution de Na_2 – EDTA :

50mg dans 50 ml de tampon phosphate.

La solution EDTA – Méthionine (0,1 mM, 13 mM) :

11,16 ml (Na_2 – EDTA) + 580 mg Méthionine et compléter à 100 ml par le tampon phosphate.

La solution de NBT (75 μM) :

10, 79 mg dans 5ml de tampon phosphate.

La solution de Riboflavine (2 μM) :

10 mg dans 100 ml de tampon phosphate.

8. Dosage de l'activité enzymatique de la Glutathion-S-Transférase (GST)

CDNB (0,02 M) :

Dissoudre 202,55 mg CDNB dans 50 ml d'éthanol absolu.

Solution GSH (0,1 M) :

Dissoudre 153,65 mg GSH dans 50 ml d'eau distillée.

9. Dosage de l'activité enzymatique l'acétylcholinestérase (AChE)

Tampon phosphate 0.1M, PH 7.4 :

Solution A, dissoudre 1.7418 g de K_2HPO_4 dans 100 ml d'eau distillé

Solution A, dissoudre 1,3609 g de KH_2PO_4 : dans 100 ml d'eau distillé

Mélange 5 ml de la solution A avec 91.5 ml de la solution B

TNB / NaHCO_3 :

NaHCO₃ 150% (15 mg dans 10ml de tampon phosphate)

DTNB : 39, 6 mg dans 10 ml (tampon phosphate / NaHCO₃)

Acétylthiocholine:

13.031 g dans 100 ml

Préparation des concentrations de l'extrait :

Définition de la ppm :

La ppm est définie comme suit

ppm = partie par million = $\text{extrait} \times 10^6 / \text{solvant à ajouter}$

ppm µg	16000 ppm	4000 ppm	2000 ppm	1000 ppm	500 ppm
1/64	50	12.5	6.25	3,125	1,5625
1/32	100	25	12.5	6.25	3,125
1/16	200	50	25	12.5	6.25
1/8	400	100	50	25	12.5
1/4	800	200	100	50	25
1/2	1600	400	200	100	50
1/1	3200	800	400	200	100

On a le choix de préparer soit : 500 ppm ,1000 ppm, 2000 ppm,4000ppm ou 16000ppm.

Elaboration des concentrations :

$$4000 \text{ (ppm)} * 40 \text{ (}\mu\text{l)} \text{ (extrait)} / 200 \text{ (}\mu\text{l)} \text{ (volume total)} = 800 \mu\text{g}$$

$$2000 \text{ (ppm)} * 40 \text{ (}\mu\text{l)} \text{ (extrait)} / 200 \text{ (}\mu\text{l)} \text{ (volume total)} = 400 \mu\text{g}$$

$$1000 \text{ (ppm)} * 40 \text{ (}\mu\text{l)} \text{ (extrait)} / 200 \text{ (}\mu\text{l)} \text{ (volume total)} = 200 \mu\text{g}$$

$$500 \text{ (ppm)} * 40 \text{ (}\mu\text{l)} \text{ (extrait)} / 200 \text{ (}\mu\text{l)} \text{ (volume total)} = 100 \mu\text{g}$$

$$250 \text{ (ppm)} * 40 \text{ (}\mu\text{l)} \text{ (extrait)} / 200 \text{ (}\mu\text{l)} \text{ (volume total)} = 50 \mu\text{g}$$

$$125 \text{ (ppm)} * 40 \text{ (}\mu\text{l)} \text{ (extrait)} / 200 \text{ (}\mu\text{l)} \text{ (volume total)} = 25 \mu\text{g}$$

$$62.5 \text{ (ppm)} * 40 \text{ (}\mu\text{l)} \text{ (extrait)} / 200 \text{ (}\mu\text{l)} \text{ (volume total)} = 12.5 \mu\text{g}$$

Exemple pour préparer 4000 ppm :

$$m=3 \text{ mg} = 3 \times 10^{-3} \text{ g (m : la masse de l'extrait)}$$

$$4000 = 4 \times 10^3 = \frac{3 \times 10^{-3} \text{ extrait}}{x \text{ volume à ajouter à l'extrait}} \times 10^6$$

$$x = 3 \times \frac{10^{-3}}{4} = 3 \times 250 = 750 \text{ } \mu\text{l (c'est le volume à ajouter)}$$

La masse de l'extrait est choisie entre 4-5 mg

On prépare 07 dilutions qui sont : $(\frac{1}{1}, \frac{1}{2}, \frac{1}{4}, \frac{1}{8}, \frac{1}{16}, \frac{1}{32}, \frac{1}{64})$.

On veut préparer 4000 ppm de l'extrait :

$$V = 5 \text{ mg} \times 250 \text{ } \mu\text{l} = 1250 \text{ } \mu\text{l (volume à ajouter pour la masse d'extrait)}$$

(1/1) \longrightarrow 5 mg (extrait) + 1250 μl du solvant

(1/2) \longrightarrow 500 μl solvant + 500 μl de (1/1)

(1/4) \longrightarrow 500 μl solvant + 500 μl de (1/2)

(1/8) \longrightarrow 500 μl solvant + 500 μl de (1/4)

(1/16) \longrightarrow 500 μl solvant + 500 μl de (1/8)

(1/32) \longrightarrow 500 μl solvant + 500 μl de (1/16)

(1/64) \longrightarrow 500 μl solvant + 500 μl de (1/32)

Publications & Communications scientifiques

LISTE DES COMMUNICATIONS

Publications

Tichati, L., Trea, F., & Ouali, K. (2019). Potential Role of Selenium Against Hepatotoxicity Induced by 2, 4-Dichlorophenoxyacetic Acid in Albino Wistar Rats. *Biological trace element research*, 1-9.

Benzaid, C., **Tichati, L.**, Djeribi, R., & Rouabhia, M. (2019). Evaluation of the Chemical Composition, the Antioxidant and Antimicrobial Activities of *Mentha× piperita* Essential Oil against Microbial Growth and Biofilm Formation. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*, 22(2). 335-346.

Rihani, A., **Tichati, L.**, & Soumati, B. (2018). Isolation and identification of lipase producing fungi from local olive oil manufacture in east of ALGERIA. *Scientific Study & Research. Chemistry & Chemical Engineering, Biotechnology, Food Industry*, 19(1), 13-22.

Communication internationale affichée

Tichati, L., Ouali, K. (2017). Contribution à l'étude phytochimique, activité antioxydante et antibactérienne de l'extrait brut de *Thymus munbyanus supb. coloratus*. Huitièmes Journées Scientifiques Internationales sur la Valorisation des Bioressources, 5-7 mai 2017, Monastir. Tunisie.

Tichati, L., Ouali, K. (2017). Etude phytochimique et activité biologique des extraits du *Cistus albidus*. 6ème congrès international de Physiologie et Bio-surveillance de l'environnement, 18- 21 décembre 2017. Douz. Tunisie.

Tichati, L., Ouali, K. (2018). (2018). Hépatotoxicité et état de stress oxydatif induits par le 2.4-d chez le rat Wistar, VIème Congrès International de Biotechnologie et Valorisation des Bioressources 20 – 23 Mars 2018, THABRACA – Tabarka, Tunisie.

Tichati, L., Trea, F., Ouali, K. (2019). L'effet neuroprotecteur de l'extrait aqueux de *Thymus munbyanus* vis-à-vis la toxicité induite par le 2-4-D chez le rat Wistar. VIIème congrès

International de Biotechnologie et Valorisation des Bioressources ,20 au 23 mars 2019, Tabarka.
Tunisie.

Communication orale

Tichati, L., Trea, F., Ouali, K. (2020). Néphrotoxicité et état de stress oxydatif induits par l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique chez le rat Wistar. Les 1ères Journées Nationales des Sciences Naturelles (JNSN), 29 - 30 Janvier 2020, Ecole Normale Supérieure de Ouargla.

Tichati, L., Trea, F., Ouali, K. (2020). Effet prophylactique d'un oligoélément le sélénium sur l'hépatotoxicité induite par l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique. Les 1ères Journées Nationales des Sciences Naturelles (JNSN) ,29 - 30 Janvier 2020, Ecole Normale Supérieure de Ouargla.



Potential Role of Selenium Against Hepatotoxicity Induced by 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid in Albino Wistar Rats

Lazhari Tichati¹ · Fouzia Trea¹ · Kheireddine Ouali¹

Received: 11 February 2019 / Accepted: 5 June 2019
© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2019

Abstract

The present study aims to investigate the hepatoprotective effects of selenium on toxicity induced by ‘Désormone Lourde’ based on 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in Wistar rats. Male Wistar rats were divided into four groups and were treated orally. The (C) group was used as a control, while the test groups were treated with Se (0.2 mg/kg b.w.), 2,4-D (5 mg/kg b.w.) or both (2,4-D + Se) for 4 weeks. Our results showed that chronic treatment with 2,4-D resulted in hepatotoxicity, as revealed by an increase in liver function markers Aminotransferases (ALT, AST), alkaline phosphatase (ALP), lactate dehydrogenase (LDH) and total bilirubin (TB), along with reduced total protein content and albumin. An overall pro-oxidant effect was associated with a decrease in the reduced glutathione (GSH) content and the enzymatic activity of glutathione-S-transferase (GST), catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPx), and an increase in malondialdehyde (MDA) and protein carbonyl levels (PCO). Microscopic observation of liver in 2,4-D-treated rats reveals lesions, which results in perivascular inflammatory infiltration around the vessel, sinusoidal dilatation and vacuolization of hepatocytes. However, selenium supplementation in 2,4-D-treated rats elicited a reduction in the toxic effects of the pesticide by improving the studied parameters, which was confirmed by the histological study of the liver. Selenium appears to have a promising prophylactic effect through its effective anti-radical action against the hepatotoxic effects of 2,4-D.

Keywords 2,4-D · Antioxidant enzymes · Hepatotoxicity · Oxidative stress · Rat · Selenium

Introduction

Phenoxy herbicides form a family of agrochemical substances that have been used since the 1950s in various cultures, including silviculture. One hundred of these derivatives are still present on the world market as a result of agricultural and commercial exploitation [1, 2]. This is the case for 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid), a chemical analogous to the natural systemic selective auxin indole-3-acetic acid (IAA) [3], which is marketed in forms including free acids, esters and/or salts. These various forms present similar

toxicity, according to the results of more than 60 studies undertaken by the ‘Industry Task Force II’ group [4]. The 2,4-D molecule is the active adjuvant of the ‘Désormone Lourde’, a commercial formula containing esterified 2,4-D, and the 2,4-D is used as a selective herbicide to treat cereals, grass and grassland areas (Fig. 1). As the most widely used form of 2,4-D worldwide [5, 6], including in Algeria, this remains the herbicide most commonly used by farmers due to low cost and low-dose efficacy. However, it represents a risk to health and the environment [7]. It was reported that 2,4-D is more likely to affect the liver [8], kidneys [9], lipid profiles [10], the nervous system [11], reproduction [12] and blood [13].

Recent studies indicate that exposure to 2,4-D promotes oxidative stress via the generation of free radicals and induces lipid peroxidation in mammalian tissues [14, 15]. Recently, Schreinemachers [16] has reported that human exposure to 2,4-D causes an alteration of lipid and carbohydrate metabolism. The latter is a potential risk factor for myocardial infarction and the development of type 2 diabetes. In addition, the work of Bors et al. [17] and Bukowska et al. [18] on human erythrocytes have shown an alteration of certain antioxidant enzymes such as erythrocyte catalase following exposure to

✉ Kheireddine Ouali
kheireddine.ouali@univ-annaba.dz

Lazhari Tichati
lazherbio@hotmail.fr

Fouzia Trea
tfouzia70@yahoo.fr

¹ Present address: Laboratory of Environmental Biosurveillance (LBSE), Department of Biology, Faculty of Sciences, Badji Mokhtar University, BP 12 Sidi Amar, 23000 Annaba, Algeria

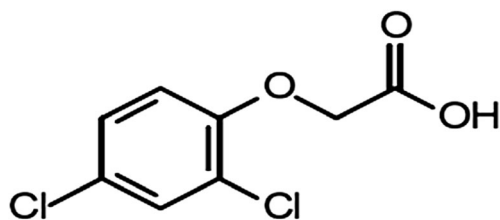


Fig. 1 Chemical structure of 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid)

2,4-D. Superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), catalase (CAT), glutathione S-transferase enzymes and non-protein elements such as reduced glutathione (GSH) are part of the first line of defence in mammalian tissues [19]. Reactive oxygen species (ROS) are likely to deplete the activity of these systems; however, antioxidant molecules such as vitamins E and C, and trace elements such as selenium and zinc, are essential to strengthen the body's antioxidant defences and prevent oxidative damage [20, 21]. Selenium is a highly important micronutrient in human nutrition [22], known for its antioxidant properties [23, 24], and it functions through the expression of selenoproteins [25]. Its biological effects are directly related to its integration into the structures of different proteins in the form of a cofactor or amino acid [26], including glutathione peroxidase (GPx), seroprotein P (seP) and thioredoxin reductase (TrxR) [27]. Selenium is important in several biochemical and physiological processes, including the biosynthesis of coenzyme Q, regulation of ionic flows through membranes, maintenance of keratinal integrity and stimulation of antibody synthesis [28]. It plays a major role in metabolic disorders including hyperlipidaemia, hyperglycaemia and hyperphenylalaninaemia due to its antioxidant properties [29]. Furthermore, it participates in the protection and repair of DNA [30] and can prevent atherosclerosis and cancer [31–33].

Recent studies have shown that the antioxidant and hepatoprotective activities of this trace element are effective against a wide range of xenobiotics [34–38]. The aim of this study is to attempt to thwart the effect of 2,4-D subchronic toxicity through selenium supplementation in Wistar rats.

Materials and Methods

Chemicals and Reagents

The commercial formulation of 2,4-D used Désormone Lourd EC. It was dosed at 600 g of 2,4-D acid (butyl glycol ester) per litre of commercial solution, as available in Algeria, with register number R.0947009, and were prepared by the addition of appropriate volumes of distilled water.

Sodium selenite (Na_2SeO_3) was purchased from Sigma Chemical Co. (St Louis, France), and reduced glutathione (GSH), DTNB [5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid] and

thiobarbituric acid (TBA) were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, France). All other chemicals were of analytical grade.

Animals

In our study, we used 24 Wistar male rats from the Pasteur Institute (Algiers, Algeria), aged 8 weeks, with an average weight of 220 ± 10 g. Rats were kept in an animal facility at a temperature of 22 ± 1 °C, with a photoperiod of 12 h/12 h and 50–55% relative humidity of the air. A standard pellet diet (ONAB; Bejaia, Algeria) and clean tap water were given ad libitum throughout the study. After 2 weeks of adaptation, rats were randomly divided into control and test groups.

Experimental Protocol

All experimental procedures were conducted according to the International Guidelines for Laboratory Animal Care and Use (Council of European Communities) [39] and were approved by the University Ethics Committee.

Rats were treated as follows:

- Group I (control): rats received 1 mL of distilled water via oral gavage.
- Group II (selenium): rats were treated with Se administered by oral gavage at 0.2 mg/kg/b.w./day for 4 weeks.
- Group III (2,4-D): rats were treated with 2,4-D administered by oral gavage at 5 mg/kg/b.w./day for 4 weeks.
- Group VI (2,4-D + Se): rats were treated with 2,4-D at a dose of (5 mg/kg/b.w./day) and Se (0.2 mg/kg/b.w./day) for 4 weeks. All chemicals were dissolved in distilled water.

The dose of selenium used was chosen in a way that has been suggested to provide protection against the oxidative stress induced in several tissues [35] Additionally, the dose of the pesticide was based on the previous study of Nakbi et al. [40], in which (5 mg/kg/b.w.) of 2,4-D caused oxidative damage.

Treatment continued for 4 weeks, and the weight of rats was recorded daily in the morning at the same time. At the end of the treatment period, rats were sacrificed by cervical decapitation, blood samples were immediately collected in polyethylene heparin and plain labelled tubes and these samples were centrifuged at $2500 \times g$ for 15 min at 4 °C. The livers were carefully removed, rinsed with a 0.9% NaCl solution and weighed. Plasma and liver were stored at -20 °C.

Preparation of Liver Homogenate

One gram of the liver was homogenized in 3 mL of phosphate buffer (1:3 weight/volume PBS, pH 7.4), followed by a

centrifugation of the cell suspension (9000×g for 15 min at 4 °C), and the resulting supernatant was used to determine the reactive substances of thiobarbituric acid (TBA), reduced glutathione (GSH), protein carbonyl (PCO) and protein levels and to measure GPx, GST and CAT enzymatic activity.

Biochemical Assays

The different biochemical parameters were measured by the spectrophotometric method using ready-to-use kits. Spinreact boxes were used for the determination of total protein (TP), albumin (Alb), total bilirubin (TB) and serum enzyme activities of aspartate aminotransaminase (AST), alanine aminotransaminase (ALT), alkaline phosphatase (ALP), gamma-glutamyltransferase (γ -GT) and lactate dehydrogenase (LDH).

Protein Assay

Protein concentrations were measured spectrophotometrically at 595 nm, according to the method of Bradford [41], using bovine serum albumin as standard.

Determination of Lipid Peroxidation

Lipid peroxidation levels of hepatic homogenates were estimated by measuring the formation of the substances reacting with thiobarbituric acid (TBARS) using the Buege and Aust method [42]. The absorbance of the TBA-MDA complex was determined at 532 nm.

Determination of Reduced Glutathione

Liver glutathione (GSH) levels were estimated using a colorimetric method as mentioned by Ellman (1959) and modified by Jollow et al. [43]. based on the development of a yellow colour when DTNB (5,5-dithio-bis-2-nitrobenzoic acid) is added to compounds containing sulphhydryl groups. The absorbance was read at 412 nm, and the total GSH contents is expressed as $\mu\text{mol GSH/mg protein}$.

Determination of Protein Carbonyl Levels

Protein carbonyl groups were measured in liver homogenate by using the method of Levine et al. [44], the principle of which is based on the carbonyl group reaction with 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH), thus leading to the formation of a stable 2,4-hydrazone (DNP) product, and the absorbance of the solution was measured at 370 nm.

Determination of Activities of Antioxidant Enzymes

The activity of glutathione peroxidase (GPx) (EC 1.11.1.9) was measured at 420 nm, according to the Flohe and Günzler technique [45]. The activity of superoxide dismutase (E.C.1.15.1.1) was determined using the Beyer and Fridovich method [46]. Activity was evaluated by measuring the ability to inhibit the photo reduction of nitro blue tetrazolium (NBT). Catalase (CAT) (EC 1.11.1.6) activity was measured using the Aebi method [47], and this result is based on the enzyme's ability to induce the disappearance of hydrogen peroxide by reducing the absorption capacity at 240 nm for 1 min. The glutathione S-transferase (GST) (EC 2.5.1.18) activity was determined through the use of the method of Habig et al. [48].

Histological Study

Liver fragments were rinsed with physiological water and fixed in a Bouin solution for 24 h, and then liver portions were stained with haematoxylin and eosin (H&E) [49]. Preparations were then dried and observed with the Leica M18 optical microscope.

Statistical Analysis

The results were presented as the means \pm standard error of the mean (SEM), and the comparison between different groups was performed after a variance analysis (ANOVA) followed by Tukey's post hoc test for multiple comparisons with GraphPad Prism 7 software (Prism 7, version 7.00, GraphPad Software, California, USA). Differences were considered significant when $p < 0.05$.

Results

Effect of Treatment on Body Weight and Absolute and Relative Liver Weight

Body weight progressively increased throughout the study in all groups and was associated with growth retardation in 2,4-D-treated rats, although there were no significant differences between them. A significant increase in the absolute and relative weight of the liver was recorded in the group treated by 2,4-D (+ 14.52% and + 23.87%, respectively) and in the (2,4-D Se) group (+ 9.13% and + 12.84%) and in the relative weight in the (2,4-D Se) group (+ 12.84%) compared with the control group (Table 1).

Treatment Effects on Biochemical Parameters

Results observed after serum assays of biochemical parameters are illustrated in Table 2. The results indicate a major

Table 1 Body weight gain, and absolute and relative weight of liver in control (C) and treated rats (Se; 2,4-D; 2,4-D + Se) for 4 weeks

Parameters	Treatments			
	Control	Se	2,4-D	2,4-D + Se
Initial weight (g)	223.33 ± 11.94	224.16 ± 9.86	226.66 ± 8.81	224.50 ± 9.95
Final weight (g)	278.83 ± 10.29	272.33 ± 9.74	264.37 ± 6.80	273.83 ± 8.59
Weight gain (%)	27.53 ± 3.85	21.76 ± 1.79	18.07 ± 1.61	23.28 ± 2.75
Absolute liver weight (g)	07.32 ± 0.25	07.29 ± 0.20 [#]	08.36 ± 0.22*	07.95 ± 0.12
Relative liver weight (g/100 g b.w.)	02.51 ± 0.05	02.68 ± 0.09 [#]	03.34 ± 0.12**	03.01 ± 0.08*

Values are given as the mean ± SEM. for groups of six animals each. Selenium (Se); 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D). Significant difference compared with the control group (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$). Significant difference compared with the 2,4-D-treated group ([#] $p < 0.05$)

metabolic disturbance. The administration of 2,4-D in rats resulted in a very significant increase in TB, ASAT, ALP and LDH ($p < 0.01$) and a significant increase in γ -GT and ALAT ($p < 0.05$), which were accompanied by a decrease in plasma contents of total protein and albumin ($p < 0.05$) compared with control. However, the 2,4-D/Se combination demonstrated a relative stability of these analysed parameters with respect to TB, ASAT, LDH, ALP and LDH ($p < 0.05$).

Treatment Effects on Hepatic Oxidative Stress Parameters

Regarding the oxidative stress effect of 2,4-D on the hepatic protein fraction, our results showed a significant increase in carbonyl protein groups and MDA ($p < 0.01$), and a decrease in GSH ($p < 0.05$), in the 2,4-D-treated group compared with the control group. However, supplementation with Se appears to attenuate the oxidative effect of 2,4-D, resulting in a significant decrease in lipid peroxidation and protein carbonyl ($p < 0.05$) and an increase in the GSH content (Table 3)

Treatment Effects on Antioxidant Enzyme Activities in Liver

The oral administration of 2,4-D for 4 weeks of treatment resulted in a highly significant decrease in SOD activity ($p < 0.01$) and a significant decrease in the activities of GST, GPx and CAT ($p < 0.05$) in liver tissues compared with the control group. In contrast, the administration of Se revealed a significant increase in GPx activity accompanied by improved SOD and GST activities ($p < 0.05$) (Fig. 2, Fig. 3).

Histological Study

Representative photomicrographs of the control and 2,4-D-treated rat liver sections are presented in Fig. 4.

The livers of control rats show normal hepatic cells and a normal lobular architecture marked by the presence of hepatic (H) pores separated by sinusoids (S) (Fig. 4a, b). However, in 2,4-D-treated animals (Fig. 4c–h), the severe alterations in the architecture of hepatic tissue are shown, represented by mononuclear cell infiltration with vacuole degeneration (DV)

Table 2 Plasma biochemical parameters in control (C) and treated rats (Se; 2,4-D; 2,4-D + Se) for 4 weeks

Parameters	Treatments			
	Control	Se	2,4-D	2,4-D + Se
Total protein (g/L)	69.24 ± 5.48	72.39 ± 4.61 [#]	52.18 ± 2.85*	58.17 ± 7.55
Albumin (g/L)	47.16 ± 1.89	45.72 ± 2.56 [#]	39.02 ± 2.84*	42.05 ± 3.19
γ -GT (IU/L)	03.72 ± 0.49	03.94 ± 1.02	05.84 ± 0.33*	05.51 ± 0.84
TB (mg/L)	01.87 ± 0.20	01.94 ± 0.26	03.72 ± 0.18**	02.63 ± 0.35*
ASAT (IU/L)	140.17 ± 11.60	151 ± 8.01 [#]	223.07 ± 9.43**	195.90 ± 7.63*
ALAT (IU/L)	54.65 ± 7.52	58.24 ± 7.34 [#]	90.01 ± 11.50*	77.53 ± 4.02
ALP (IU/L)	127.68 ± 10.61	135.50 ± 14.45 [#]	185.28 ± 8.30**	163.11 ± 9.25*
LDH (IU/L)	654.57 ± 50.94	611.66 ± 76.57 ^{###}	1439.83 ± 145.77**	990.16 ± 119.31 [#]

Values are given as the mean ± SEM for groups of six animals each. Selenium (Se); 2,4 dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D); aspartate aminotransferase (ASAT); alanine aminotransferase (ALAT); alkaline phosphatase (ALP); γ -glutamyl transferase (γ -GT); total bilirubin (TB); lactate dehydrogenase (LDH). Significant difference compared with the control group (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$). Significant difference compared with the 2,4-D-treated group ([#] $p < 0.05$, ^{###} $p < 0.01$)

Table 3 Reduced glutathione, malondialdehyde and carbonyl protein group levels in control (C) and treated rats (Se; 2,4-D; 2,4-D + Se) for 4 weeks

Parameters	Treatments			
	Control	Se	2,4-D	2,4-D + Se
GSH ($\mu\text{mol}/\text{mg prot}$)	01.68 \pm 0.13	01.60 \pm 0.08 ^{##}	01.15 \pm 0.05*	01.26 \pm 0.07
MDA (nm/mg prot)	01.02 \pm 0.07	00.97 \pm 0.10 ^{##}	01.49 \pm 0.08**	0132.4 \pm 0.05*
CPO ($\mu\text{mol}/\text{mg prot}$)	26.90 \pm 1.50	25.39 \pm 3.43 ^{##}	41.60 \pm 1.97**	35.61 \pm 2.73*

Values are given as the mean \pm SEM for groups of six animals each. Selenium (Se); 2,4 dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D); reduced glutathione (GSH); malondialdehyde (MDA); protein carbonyl (PCO). Significant difference compared with the control group (* p < 0.05, ** p < 0.01). Significant difference compared with the 2,4-D-treated group (# p < 0.05, ## p < 0.01)

around a dilated centrilobular vein (VC) and hepatic sinusoid congestion. Furthermore, the cytoplasm appeared to be extensively vacuolated and contained large numbers of lipid droplets (Fig. 4h). In the sections of 2,4-D selenium-treated rats, a normal architecture of hepatic cells was shown, and we noted a decrease in both the intensity of inflammation and the size of the hepatic vein (Fig. 4i, j).

Discussion

‘Désormone Lourde’ based on 2,4-D is an herbicide widely used in agriculture in Algeria, particularly to control the development of adventitious cereal crops (soft wheat, durum wheat, barley and oats).

The toxicity of 2,4-D has been the subject of several experimental studies. These studies have shown that 2,4-D inhibited the antioxidant enzyme system in a dose-dependent manner and, thereby, promotes the occurrence of liver damage [8, 15]. The present study was able to focus for the first time on the protective effect of sodium selenite supplementation on 2,4-D hepatotoxicity in rats. In toxicology studies, the estimation of organ weights, primarily the liver, appears to be a good indicator to

assess the harmful effects of xenobiotics [50, 51]. The present study revealed a significant increase in relative and absolute liver weight. This hypertrophy could be explained by enhanced solicitation of detoxification mechanisms in response to the toxic effects of the herbicide. In this sense, Maronpot et al. [52] and Sharma et al. [53] reported that pesticide ingestion in rats is accompanied by an increase in hepatic metabolism and renal excretion, resulting in an increase in relative liver and kidney mass. In addition, our results are consistent with those of Nakbi et al. [40], which show that the administration of 2,4-D at 5 mg/kg body weight for 4 weeks in rats significantly increased liver weight.

Likewise, Tayeb et al. [54] showed that the administration of 2,4-D at doses of 15.75 and 150 mg/kg for 28 days in male rats resulted in a significant increase in relative and absolute liver weight. These weight variations correlate with liver tissue alterations. Sinusoidal spaces, centrilobular vein congestion and cellular necrosis were observed in rats receiving 2,4-D. Our results are consistent with those of Nakbi et al. [10], which showed that exposure to 2,4-D at 5 mg/kg body weight for 4 weeks generates damage from vascularization and stimulates hepatocyte necrosis. Similarly, Mountassif et al. [55] and Deshmukh and Ramteke [13] have noted severe

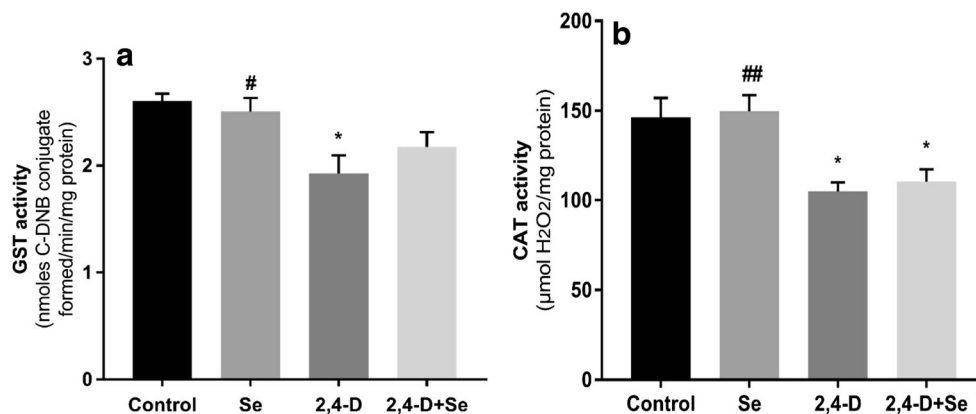


Fig. 2 Enzymatic activity of GST (nmoles C-DNB conjugate formed/min/mg protein) (a) and CAT (nmol H_2O_2 /min/mg protein) (b) in the liver in control and treated rats (Se; 2,4-D; 2,4-D + Se) for 4 weeks. Values are given as the mean \pm SEM of 6 rats. Selenium (Se); 2,4-

dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D); glutathione S-transferase (GST); catalase (CAT). Significant difference compared with the control group (* p < 0.05). Significant difference compared with the 2,4-D-treated group (# p < 0.05, ## p < 0.01)

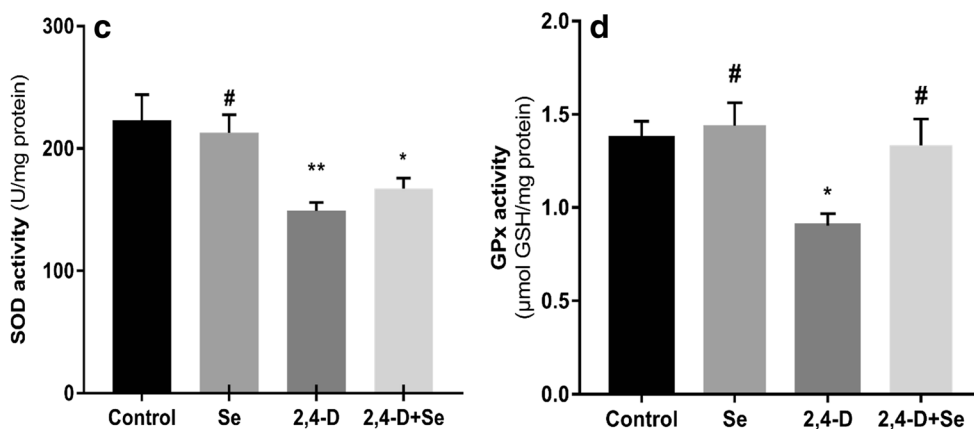


Fig. 3 Enzymatic activity of SOD (U/mg prot) (c) and GPx ($\mu\text{mol GSH/mg prot}$) (d) in the liver in control and treated rats (Se; 2,4-D; 2,4-D + Se) for 4 weeks. Values are given as the mean \pm SEM of 6 rats. Selenium (Se); 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D); superoxide dismutase (SOD);

glutathione peroxidase (GPx). Significant difference compared with the control group (** $p < 0.01$, * $p < 0.05$). Significant difference compared with the 2,4-D-treated group ($\#p < 0.05$, $\##p < 0.01$)

alterations in liver architecture accompanied by cell necrosis. These changes in biometric and histopathological parameters correlate with the alteration in responses of hepatic enzyme markers to the toxicity of herbicide. In fact, the administration of 2,4-D at 5 mg/kg body weight for 4 weeks in rats resulted in a solicitation of transaminases (AST, ALT), γ -GT, PAL, LDH and bilirubin, with a decrease in total protein levels, especially albumin. These biochemical changes highlight a cytolytic effect induced by 2,4-D. In this sense, Celik et al. [56] showed that this herbicide could alter membrane permeability and leak enzymes to the plasma. In addition, Al-Baroudi et al. [57] noted an increase in ALAT activity, a marker of membrane hepatocytic cytolysis.

This 2,4-D toxicity appears to be mediated by its pro-oxidant effect, thus favouring the hyperproduction of free radicals. The latter could interact with biological molecules such as membrane and mitochondrial proteins, lipids and DNA, thereby causing a malfunction of cellular metabolism. Indeed [58], our results related to the indicator parameters of oxidative stress state, namely the concentrations of MDA, protein carbonyl and hepatic GSH content, in addition to the quality of the responses of antioxidant enzymes, catalase, SOD, GPx and GST, clearly support this hypothesis. Our results distinctly show that significant increases in lipoperoxide and carbonyl protein groups in rats treated with 2,4-D at 5 mg/kg for 4 weeks are associated with decreases in hepatic GSH concentrations, catalase activity, SOD, GPx and GST. This response profile of 2,4-D supports an imbalance between oxidants (free radicals) and antioxidants, which is the origin of the installation of OS. Several recent studies have found high levels of MDA in 2,4-D-treated rats, similar to our results [40]. These rats are able to oxidize lipids by generating different aldehydes such as MDA, a toxic compound that could alter the fluidity and function of membranes [59]. In a recent study

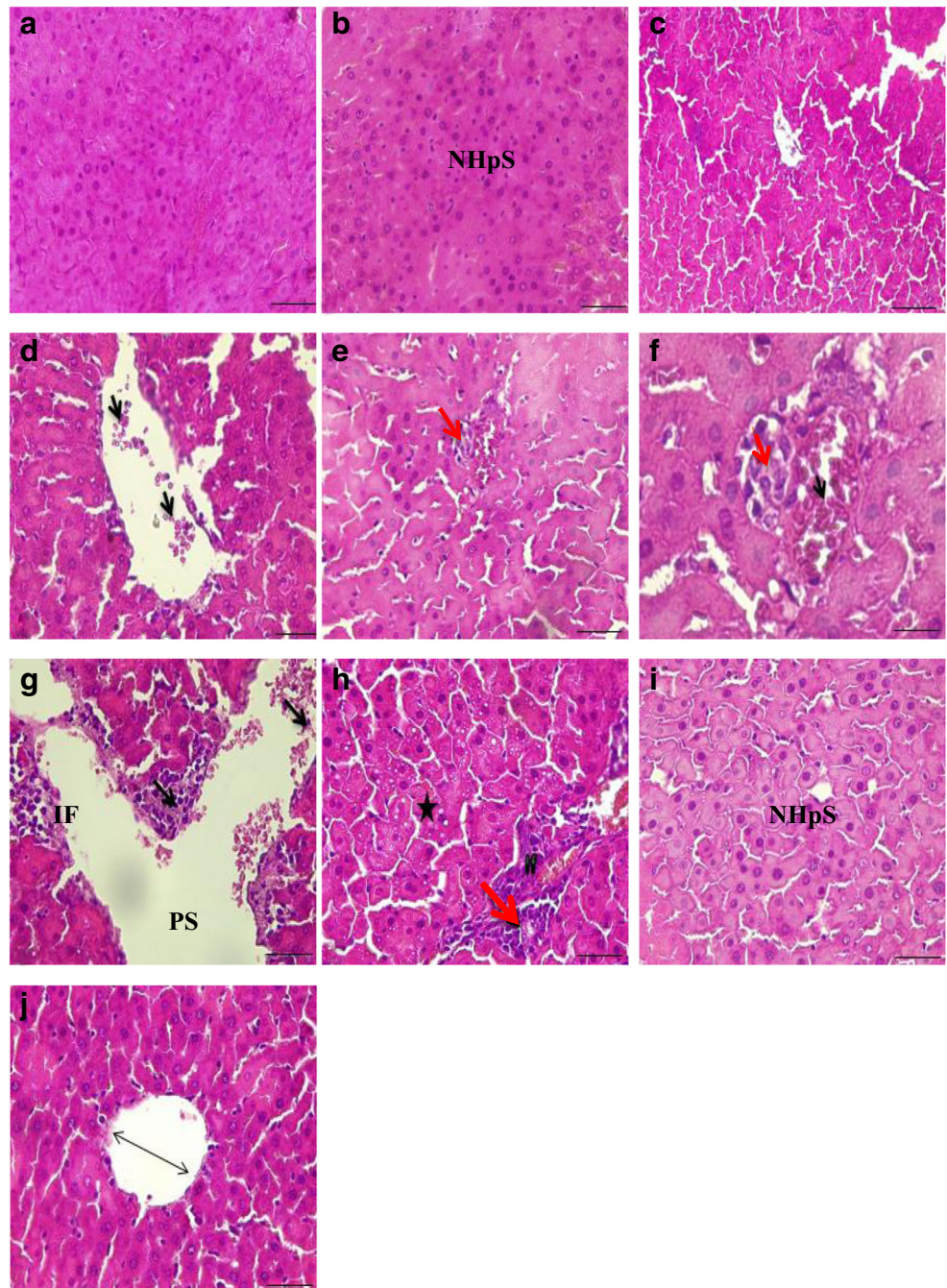
on mouse hepatocytes, Dakhakhni et al. [15] indicate that 2,4-D causes a deterioration in lipid polarity which makes them vulnerable to free radical attacks.

In our work, the administration of selenium at 0.2 mg/kg appears to exert a remedial and even protective effect against the toxicity of 2,4-D at the hepatic level: this is revealed by the restoration of serum enzyme markers, transaminases, ALP and LDH, as well as by the restoration of protein levels, albumin and tissue architecture. This prophylactic effect of Se has also been reported by Ben Amara et al. [60] and Djefal et al. [21] against the respective toxicities of dimethoate and methomyl. Se supplementation could modulate the expression of certain selenoproteins such as glutathione peroxidase 1, methionine-R-sulfoxide reductase 1 (MsrB1), selenoprotein S and selenoprotein P, which indirectly results in the decrease in intracellular ROS [61].

The administration of Se to 2,4-D-treated rats has also been proven able to reduce MDA and protein carbonyl levels, reinforcing the important role of Se as a shield against lipid and protein oxidation [60, 61]. El-Demerdash and Nasr [35] showed that selenium supplementation in the form of sodium selenite (200 $\mu\text{g/kg/day}$) significantly reduced serum MDA in rats treated with an organophosphorous pesticide, diazinon.

This antioxidant effect of Se is likely due to the modulation of the body's antioxidant capacities relating to the solicitation of certain enzymes. In fact, the administration of Se in the 2,4-D-treated group led to a considerable improvement in the enzyme activities of GPx, CAT, GST and SOD. As a cofactor of many antioxidant enzymes, such as glutathione peroxidase GPx and thioredoxin reductase, Se can prevent the formation of free radicals by increasing the activity of these enzymes within the target tissues [34, 37, 38, 62]. The recent study of Xia et al. [63] on hepatopancreas, gills and haemocytes of *Anodonta woodiana*, a freshwater bivalve exposed to 2,4-DCP, 2,4,6-TCP and PCP, has

Fig. 4 Representative haematoxylin eosin–stained liver sections from control Wistar rat (**a, b**) or 2,4-D (**c, d, e, f, g, h**) and selenium treatment (**i, j**) during 30 days. Staining was performed to detect fibrotic areas (indicated by red arrows); arrows: mononuclear cell infiltrates in the portal system (PS), If: hepatic cells inflammation, lipids vacuoles Asterix: **i** and **j** show normal hepatic structure (NHpS). Sections were observed at 400-fold magnification (scale bars 50 μm)



highlighted the crucial role of the selenium-dependent glutathione peroxidase in suppressing oxidative stress.

Conclusion

Based on the data from the present study, chronic exposure to 2,4-D caused hepatotoxicity in rats, resulting in increased lipid peroxidation and increased free radical production that

impaired the hepatic antioxidant defence. Selenium supplementation improves the ability of enzymatic antioxidants. However, the precise mechanism of protection cannot be verified from the results of this study so practical investigations are needed to determine the precise mechanisms of its action.

Funding Information This research is supported by the General Direction of Scientific Research and Development of Technology and Ministry of Higher Education and Scientific Research, DGRSDT-MESRS Algeria.

Compliance with Ethical Standards

All experimental procedures were conducted according to the International Guidelines for Laboratory Animal Care and Use (Council of European Communities) [39] and were approved by the University Ethics Committee.

References

- Grube A, Donaldson D, Kiely T, Wu L, Kiely T (2011) Pesticides industry sales and usage: 2006 and 2007 market estimates. U.S. Environmental Protection Agency 1–41 https://doi.org/https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-10/documents/market_estimates2007.pdf
- Fenner K, Canonica S, Wackett LP, Elsner M (2013) Evaluating pesticide degradation in the environment: blind spots and emerging opportunities. *Science* 341:752–758
- Grossmann K (2010) Auxin herbicides: current status of mechanism and mode of action. *Pest Manag Sci* 66:113–120
- Bus JS, Hammond LE (2007) Regulatory progress, toxicology, and public concerns with 2,4-D: where do we stand after two decades. *Crop Prot* 26:266–269
- Peterson MA, McMaster SA, Riechers DE, Skelton J, Stahlman PW (2016) 2,4-D past, present, and future: a review. *Weed Technol* 30(2):303–345
- Smith AM, Smith MT, La Merrill MA, Liaw J, Steinmaus C (2017) 2, 4-Dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D) and risk of non-Hodgkin lymphoma: a meta-analysis accounting for exposure levels. *Ann Epidemiol* 27(4):281–289
- Islam F, Wang J, Farooq MA, Khan MS, Xu L, Zhu J, Zhou W (2018) Potential impact of the herbicide 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid on human and ecosystems. *Environ Int* 111:332–351
- Tayeb W, Nakbi A, Cheraief I, Miled A, Hammami M (2013) Alteration of lipid status and lipid metabolism, induction of oxidative stress and lipid peroxidation by 2, 4-dichlorophenoxyacetic herbicide in rat liver. *Toxicol Mech Methods* 23(6):449–458
- Troudi A, Soudani N, Samet AM, Amara IB, Zeghal N (2011) 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid effects on nephrotoxicity in rats during late pregnancy and early postnatal periods. *Ecotoxicol Environ Saf* 74(8):2316–2323
- Nakbi A, Tayeb W, Dabbou S, Chargui I, Issaoui M, Zakhama A, Miled A, Hammami M (2012) Hypolipidemic and antioxidant activities of virgin olive oil and its fractions in 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-treated rats. *Nutrition* 28:81–91
- Amel N, Wafa T, Samia D, Yousra B, Issam C, Cheraif I, Mohamed H (2016) Extra virgin olive oil modulates brain docosahexaenoic acid level and oxidative damage caused by 2, 4-Dichlorophenoxyacetic acid in rats. *J Food Sci Technol* 53(3):1454–1464
- Marouani N, Tebourbi O, Cherif D, Hallegue D, Yacoubi MT, Sakly M, Rhouma KB (2017) Effects of oral administration of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D) on reproductive parameters in male Wistar rats. *Environ Sci Pollut Res* 24(1):519–526
- Deshmukh US, Ramteke PM (2017) Hematological, biochemical alterations, and changes in histological architecture of some tissue of male Wistar rats exposed to 2, 4-D- herbicide. *Eur J Environ Ecol* 4:17–21
- Wafa T, Amel N, Issam C, Imed C, Abdelhedi M, Mohamed H (2011) Subacute effects of 2, 4-dichlorophenoxyacetic herbicide on antioxidant defense system and lipid peroxidation in rat erythrocytes. *Pestic Biochem Physiol* 99(3):256–264
- Dakhkhni TH, Raouf GA, Qusti SY (2016) Evaluation of the toxic effect of the herbicide 2, 4-D on rat hepatocytes: an FT-IR spectroscopic study. *Eur Biophys J* 45:311–320
- Schreinemachers DM (2010) Perturbation of lipids and glucose metabolism associated with previous 2, 4-D exposure: a cross-sectional study of NHANES III data, 1988-1994. *Environ Health* 9(1):11
- Bors M, Bukowska B, Pilarski R, Gulewicz K, Oszmiański J, Michałowicz J, & Koter-Michalak M (2011) Protective activity of the *Uncaria tomentosa* extracts on human erythrocytes in oxidative stress induced by 2, 4-dichlorophenol (2, 4-DCP) and catechol. *Food and chemical toxicology*49(9): 2202–2211
- Bukowska B, Bors M, Gulewicz K, Koter-Michalak M (2012) *Uncaria tomentosa* extracts protect human erythrocyte catalase against damage induced by 2, 4-D-Na and its metabolites. *Food Chem Toxicol* 50(6):2123–2127
- Ighodaro OM, Akinloye OA (2018) First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria J Med* 54(4):287–293
- Pisoschi AM, Pop A (2015) The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: a review. *Eur J Med Chem* 97:55–74
- Djeffal A, Messarah M, Boumendjel A, Kadeche L, Feki AE (2015) Protective effects of vitamin C and selenium supplementation on methomyl-induced tissue oxidative stress in adult rats. *Toxicol Ind Health* 31(1):31–43
- Papp LV, Holmgren A, Khanna KK (2010) Selenium and selenoproteins in health and disease. *Antioxid Redox Signal* 12(7):793–795
- Wrobel JK, Power R, Toborek M (2016) Biological activity of selenium: revisited. *IUBMB Life* 68(2):97–105
- Liu H, Xu H, Huang K (2017) Selenium in the prevention of atherosclerosis and its underlying mechanisms. *Metallomics* 9:21–37
- Ruseva B, Atanasova M, Tsvetkova R, Betova T, Mollova M, Alexandrova M, Laleva P, Dimitrova A (2015) Effect of selenium supplementation on redox status of the aortic wall in young spontaneously hypertensive rats. *Oxidative Med Cell Longev* 2015:1–10. <https://doi.org/10.1155/2015/609053>
- Roman M, Jitaru P, Barbante C (2014) Selenium biochemistry and its role for human health. *Metallomics* 6(1):25–54
- Reeves MA, Hoffmann PR (2009) The human selenoproteome: recent insights into functions and regulation. *Cell Mol Life Sci* 66(15):2457–2478
- Eltayeb AA, Liu Q, Ganl L, Liu H, Xu H (2004) Antagonistic effect of scutellarin on the toxicity of selenium in rat livers. *Biol Trace Elem Res* 98(3):253–264
- Wang N, Tan HY, Li S, Xu Y, Guo W, Feng Y (2017) Supplementation of micronutrient selenium in metabolic diseases: its role as an antioxidant. *Oxidative Med Cell Longev* 2017:1–13. <https://doi.org/10.1155/2017/7478523>
- Favrot C, Beal D, Blouin E, Leccia MT, Roussel AM, Rachidi W (2018) Age-dependent protective effect of selenium against UVA irradiation in primary human keratinocytes and the associated DNA repair signature. *Oxidative Med Cell Longev* 2018:1–9. <https://doi.org/10.1155/2018/5895439>
- Hatfield DL, Tsuji PA, Carlson BA, Gladyshev VN (2014) Selenium and selenocysteine: roles in cancer, health, and development. *Trends Biochem Sci* 39(3):112–120
- Rayman M (2017) Selenium Intake and Status in Health & Disease. *Free Radic Biol Med* 112:5
- Liu H, Xu H, Huang K (2017) Selenium in the prevention of atherosclerosis and its underlying mechanisms. *Metallomics* 9:21–37
- Messarah M, Klibet F, Boumendjel A, Abdennour C, Bouzerna N, Boulakoud MS, El Feki A (2012) Hepatoprotective role and antioxidant capacity of selenium on arsenic-induced liver injury in rats. *Exp Toxicol Pathol* 64(3):167–174
- El-Demerdash FM, Nasr HM (2014) Antioxidant effect of selenium on lipid peroxidation, hyperlipidemia and biochemical parameters in rats exposed to diazinon. *J Trace Elem Med Biol* 28:89–93

36. Ben-Saad H, Kammoun I, Boudawara T, Zeghal KM, Hakim A, Amara IB (2017) Effects of selenium on tebuconazole-induced hepatotoxicity in adult rats. *Res Rev Biosci* 12(2):117
37. Ansar S, Alshehri SM, Abudawood M, Hamed SS, Ahamad T (2017) Antioxidant and hepatoprotective role of selenium against silver nanoparticles. *Int J Nanomedicine* 12:7789–7797
38. Mansour SA, Mohamed RI, Ali AR (2017) Ameliorating effect of selenium against deltamethrin induced hepato-renal dysfunction and oxidative stress to pregnant rats and their offspring. *Journal of Toxicology and Pharmacology* 1(002)
39. Council of European Communities (1986) Council instructions about the protection of living animals used in scientific investigations. *Off J Eur Commun (JO86/609/CEE)* L358:1–18
40. Nakbi A, Tayeb W, Grissa A, Issaoui M, Dabbou S, Chargui I, Ellouz M, Miled A, Hammami M (2010) Effects of olive oil and its fractions on oxidative stress and the liver's fatty acid composition in 2, 4-Dichlorophenoxyacetic acid-treated rats. *Nutr Metab* 7(1):80
41. Bradford M (1976) A rapid and sensitive method for the quantities of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein binding. *Anal Biochem* 72:248–254
42. Buege JA, Aust SD (1984) Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 105:302–310
43. Jollow DJ, Mitchel JR, Zampaglione Z, Gillette JR (1974) Bromobenzene induced liver necrosis. Protective role of glutathione and evidence for 3,4-bromobenzene oxide as the hepatotoxic metabolites. *Pharmacology* 11:51–57
44. Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG et al (1990) Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* 186:464–478
45. Flohe L, Gunzler WA (1984) Analysis of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* 105:114–121
46. Beyer WF, Fridovich I (1987) Assaying for superoxide dismutase activity. *Anal Biochem* 161:559–566
47. Aebi H (1984) Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 105:121–126
48. Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB (1974) Glutathione S-transferases the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Biol Chem* 249(22):7130–7139
49. Hould R (1984) Techniques d'histopathologie et de cytopathologie. *Ed Maloine* 19(21):225–227
50. Bailey SA, Zidell RH, Perry RW (2004) Relationships between organ weight and body/brain weight in the rat: what is the best analytical endpoint? *Toxicol Pathol* 32(4):448–466
51. Sellers RS, Mortan D, Michael B, Roome N, Johnson JK, Yano BL, Perry R, Schafer K (2007) Society of Toxicologic Pathology position paper: organ weight recommendations for toxicology studies. *Toxicol Pathol* 35(5):751–755
52. Maronpot RR, Yoshizawa K, Nyska A, Harada T, Flake G, Mueller G, Ward JM (2010) Hepatic enzyme induction: histopathology. *Toxicol Pathol* 38(5):776–795
53. Sharma P, Sharma A, Jasuja ND, Joshi SC (2014) Organophosphorus compounds and oxidative stress: a review. *Toxicol Environ Chem* 96(5):681–698
54. Tayeb W, Nakbi A, Trabelsi M, Attia N, Miled A, Hammami M (2010) Hepatotoxicity induced by sub-acute exposure of rats to 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid based herbicide “Désormone lourde”. *J Hazard Mater* 180(1–3):225–233
55. Mountassif D, Kabine M, Mouchid K, Mounaji K, Latruffe N, El Kebbj MHS (2008) Biochemical and histological alterations of cellular metabolism from jerboa (*Jaculus orientalis*) by 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid: effects on D-3-hydroxybutyrate dehydrogenase. *Pestic Biochem Physiol* 90(2):87–96
56. Celik I, Tuluce Y, Isik I (2006) Influence of subacute treatment of some plant growth regulators on serum marker enzymes and erythrocyte and tissue antioxidant defense and lipid peroxidation in rats. *J Biochem Mol Toxicol* 20:174–182
57. Al-Baroudi DA, Arafat R, El-kholy T (2014) Hepatoprotective effect of chamomile capitula extract against 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid-induced hepatotoxicity in rats. *Life Sci J* 11:34–40
58. Bukowska B (2006) Toxicity of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid - molecular mechanisms. *Pol J Environ Stud* 15:365–374
59. Abbassy MA, Marzouk MA, Mansour SA, Shaldam HA, Mossa AH (2014) Impact of oxidative stress and lipid peroxidation induced by lambda-dacyhalothrin on p450 in male rats: the ameliorating effect of zinc. *J Environ Anal Toxicol* 4:1–5
60. Ben Amara I, Soudani N, Troudi A, Bouaziz H, Boudawara T, Zeghal N (2011) Antioxidant effect of vitamin E and selenium on hepatotoxicity induced by dimethoate in female adult rats. *Ecotoxicol Environ Saf* 74:811–819
61. Zhou J, Huang K, Lei XG (2013) Selenium and diabetes—evidence from animal studies. *Free Radic Biol Med* 65:1548–1556
62. Stephen AO, James O, Ikojo ER, Sunday AO (2016) Effects of selenium treatment on healing of acetic acid induced gastric ulcer in albino Wistar rats. *Am J Biomed Res* 4(1):18–22
63. Xia X, Hua C, Xue S, Shi B, Gui G, Zhang D, Wang X, Guo L (2016) Response of selenium dependent glutathione peroxidase in the freshwater bivalve *Anodonta woodiana* exposed to 2,4-dichlorophenol, 2,4,6-trichlorophenol and pentachlorophenol. *Fish Shellfish Immunol* 55:499–509

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.