

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

THÈSE

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de DOCTORAT en
SCIENCES

Option : Biologie Animale

THEME

Évaluation des effets protecteurs de la supplémentation en
quercétine et en vanilline sur la cytotoxicité induite par la
métribuzine chez le rat de la souche wistar.

Présentée par : KADECHE Lilia

Directeur de thèse : Messarah Mahfoud

Professeur, Université d'Annaba

Membres de Jury:

Président : M. Abdenmour C.

Professeur, Université d'Annaba

Examineurs : M. Khelili K.

Professeur, Université d'Annaba

M. Djabri B.

Professeur, Université de Tébessa

M. Boussekine S.

Maître de conférences (A), Université de Tébessa

M. Slimani S.

Maître de conférences (A), Université de skikda

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

Au Nom d'Allah, Le Tout Clément, Le Très Miséricordieux.

REMERCIEMENTS

En tout premier lieu, je remercie Allah le Tout-Puissant *الله سبحانه و تعالى*, L'Audient *السميع*, Le Voyant *البصير*, Le Créateur *الخالق*, L'Omniscient *العليم*, Le Préserveur *المهيمن*, Le Tout-Clément *الرحمن* et Le Très-Miséricordieux *الرحيم* de m'avoir donné la force et le courage pour dépasser toutes les difficultés afin de réaliser ce travail. Louange à L'Éternel *الحمد لله*.

Je tiens à remercier très vivement Monsieur le professeur *Abdenmour Cherif* qui nous a fait l'honneur de présider le jury.

Mes sincères remerciements, ma reconnaissance et ma gratitude extrême s'adressent à Monsieur le professeur *Messarah Mahfoud* pour sa disponibilité, ses conseils, ses encouragements inestimables et ses généreuses explications, en me laissant une large liberté pour mener à bien cette étude.

Je tiens à exprimer mes plus vifs remerciements à Monsieur le professeur *Khelili Kamel* qui nous fait l'honneur de critiquer et d'analyser ce travail.

Je remercie très vivement Monsieur le professeur *Djabri Belgacem* qui a accepté de faire partie du jury et d'apporter ses critiques constructifs.

Je tiens à exprimer mes remerciements à Madame le Docteur *Boussekine Samira* qui nous honore de sa présence en examinant ce travail.

Je voudrais aussi remercier chaleureusement Madame le Docteur *Slimani Souhila* qui a bien voulu accepté de juger ce travail.

Ma profonde reconnaissance est adressée à mes très chers parents. Merci de votre amour, patience et encouragements. Que Allah vous Garde pour nous.

Je remercie également mes chers frères et sœurs pour leur aide inestimable. Que Allah vous garde pour nous.

J'exprime ma gratitude à Monsieur Aissani S, chef du service de santé, je vous remercie pour toute votre aide.

Je remercie profondément toutes les personnes qui nous ont soutenus de pré ou de loin à la réalisation de ce travail.

RÉSUMÉS

المخلص

الميتريبيوزين، هو مبيد أعشاب شائع الاستخدام على العديد من المحاصيل الزراعية. يهدف هذا العمل إلى تحديد تأثير التعرض تحت الحاد لجرعة (133.33 مغ / كغ من وزن الحيوان) من الميتريبيوزين على تغير المؤشرات الدموية، البيوكيميائية و الحالة التأكسدية لدى ذكور الجرذان من سلالة ويستار. في نفس الوقت، تم تقييم القدرة الوقائية للكرستين و الفانيلين، مركبات بوليفينولية طبيعية، ضد هذه التغيرات التي يسببها الميتريبيوزين.

اشتملت التجربة على 48 ذكورًا من الفئران مقسمة إلى ست مجموعات من ثمانية فئران لكل مجموعة: مجموعة شاهدة، مجموعة عوملت بالكرستين بمعدل 50 ملغم / كغم، مجموعة عوملت بالفانيلين بمعدل 150 ملغم / كغم، مجموعة عوملت بالميتريبيوزين في مياه الشرب، مجموعة عوملت بالجمع بين الميتريبيوزين و الكرستين و الاخيرة بالجمع بين الميتريبيوزين و الفانيلين.

أظهرت نتائجنا أن الميتريبيوزين المقدم عن طريق الفم للجرذان، سبب فقر دم انحلاي تميز بانخفاض في المؤشرات الدموية (الكريات الدموية الحمراء، الهيموغلوبين، الهيماتوكريت و الحجم الكروي الوسطي). تغيرات في المؤشرات البيوكيميائية تمت ملاحظتها كذلك في الدم. في الواقع، أدى استخدام الميتريبيوزين الى حصول تغيرات المعايير البلازمية، خصوصا في مستويات الجلوكوز، اليوريا، الكرياتينين، البيليروبين، الدهون الثلاثية، الكولسترول، مصحوبة بزيادة في نشاط الانزيمات الناقلة لمجموعة الامين و الفوسفاتاز القلوية مع انخفاض في مستويات البروتينات الكلية. و علاوة على ذلك، كان هناك اضطراب في العوامل المضادة للأكسدة للكبد، الكلى، الدماغ والخصية (زيادة مؤشر الأكسدة الليبيدية، انخفاض نشاط أنزيم الجلوتاثيون بيروكسيداز و نقصان كمية الجلوتاثيون المرجع). هذه التغيرات كانت مصحوبة بانخفاض في وزن جسم الجرذان ، بزيادة في الوزن النسبي للاعضاء المدروسة و بتغيرات بنوية على المستوى الكبدى و الكلوي.

في حين المعالجة بالمركبات البوليفينولية (الكرستين، الفانيلين) ، كل على حدى، أدت الى تعديل في تغير المؤشرات الدموية، البيوكيميائية و التأكسدية الى مستويات قريبة من تلك المتحصل عليها عند الفئران الشاهدة. اظهرت هذه النتائج أن الفانيلين و الكرستين تمكنت من الحد من الاضطرابات الناجمة عن الميتريبيوزين بسبب خصائصها المضادة للاكسدة.

الكلمات المفتاحية : ميتريبيوزين، المبيدات، كرسنتين، فانيلين، مضادات الأكسدة، البوليفينولات،

الإجهاد التأكسدي، فئران.

ABSTRACT

Metribuzin (Mtz) is an herbicide commonly used on many agricultural crops. This work aims to determine the effects of subacute exposure at a dose of (133,33 mg / kg body weight) of Mtz, on hematological and biochemical parameters as well as oxidative status of male Wistar rats. Besides, the ability of quercetin and vanillin, natural phenolic compounds, to prevent changes induced by metribuzin was evaluated.

The experiment involved 48 male rats divided into six groups of eight rats each: a control group (T), a group treated with quercetin (Que) at a rate of 50 mg / kg, a group treated with vanillin (Va) at a rate of 150 mg / kg, a group treated with metribuzin (Mtz) in drinking water, a group treated with the combination (Mtz + Que) and the last is treated with the combination (Mtz + Va) for 21 days.

Our results showed that metribuzin administered orally to rats, causes hemolytic anemia characterized by decreased haematological parameters (red blood cells, hemoglobin, hematocrit and MCV). Biochemical alterations are also observed in the blood. Metribuzin caused, in fact, a disruption of plasma parameters including glucose, urea, creatinine, bilirubin, triglycerides, cholesterol, accompanied by an increase in enzymatic activities of transaminases and alkaline phosphatase with decreased total protein levels. Furthermore, there was a disturbance of the hepatic, renal, cerebral and testicular pro-antioxidant system (elevation of MDA; decreased GPx activities and depletion of GSH). These changes were accompanied by a reduction in the body weight of the rats, an increase in the relative weight of the organs studied and structural changes in the liver and kidney.

However, administration of the two polyphenols (quercetin, vanillin), separately, led to an adjustment of the change in hematological, biochemical and oxidative parameters to levels close to those of control rats. These results show that vanillin and quercetin can limit the disturbances caused by metribuzin due to their antioxidant properties.

Key words: Metribuzin, Pesticides, Quercetin, Vanillin, Antioxidants, Polyphenols, Oxidative stress, Rats.

RÉSUMÉ

La métribuzine (Mtz), est un herbicide utilisé couramment sur de nombreuses cultures agricoles. Ce travail de thèse vise à déterminer les effets d'une exposition subaiguë à une dose de (133,33 mg/kg de poids corporel) de Mtz, sur le profil hématologique, biochimique ainsi que le statut oxydatif des rats mâles Wistar. Parallèlement, la capacité de la quercétine et la vanilline, composés phénoliques naturels, de prévenir les changements induits par la métribuzine a été évaluée.

L'expérimentation a porté sur 48 rats mâles répartis en six groupes de huit rats chacun: un groupe témoin (T), un groupe traité par la quercétine (Que) à raison de 50 mg/kg, un groupe traité par la vanilline (Va) à raison de 150 mg/kg, un groupe traité par la métribuzine (Mtz) dans l'eau de boisson, un groupe traité par la combinaison (Mtz+Que) et le dernier est traité par la combinaison (Mtz+Va), pendant 21 jours.

Nos résultats ont montré que la métribuzine administré par voie orale aux rats, provoque une anémie hémolytique caractérisée par une diminution des paramètres hématologiques (globules rouges ; hémoglobine ; hématocrite et VGM). Des altérations biochimiques sont également constatées au niveau sanguin. La métribuzine a provoqué, en effet, une perturbation des paramètres plasmatiques, notamment des taux de glucose, urée, créatinine, bilirubine, triglycérides, cholestérol, accompagnée par une augmentation des activités enzymatiques des transaminases et de la phosphatase alcaline avec une diminution des taux de protéines totales. De plus, nous avons noté une perturbation du statut antioxydant hépatique, rénale, cérébrale et testiculaire (élévation de MDA ; diminution des activités GPx et déplétion du GSH). Ces changements ont été accompagnés d'une réduction du poids corporel des rats, d'une augmentation du poids relatif des organes étudiés et des variations structurales au niveau hépatique et rénale.

Toutefois, l'administration des deux polyphénols (quercétine, vanilline), séparément, a conduit à un ajustement du changement des paramètres hématologiques, biochimiques et oxydatifs à des niveaux proches de ceux des rats témoins. Ces résultats montrent que la vanilline et la quercétine permettent de limiter les perturbations provoquées par la métribuzine grâce à leurs propriétés antioxydantes.

Mots clé : Métribuzine, Pesticides, Quercétine, Vanilline, Antioxydants, Polyphénols, Stress oxydatif, Rats.

TABLES DES ILLUSTRATIONS

LISTE DES TABLEAUX

TABLES DES ILLUSTRATIONS

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU	TITRE	PAGE
Tableau 1	Principales ERO radicalaires et non-radicalaires	05
Tableau 2	Les grandes familles de polyphénols	26
Tableau 3	Teneur en équivalent quercétine de quelques fruits et légumes	35
Tableau 4	Les propriétés physico-chimiques de la métribuzine	50
Tableau 5	Différentes DL ₅₀ pour les rongeurs	52
Tableau 6	Composition de l'alimentation pour 1 kilogramme d'aliment	53
Tableau 7	Variation du poids corporel PC (g) des rats témoins et rats traités après 21 jours de traitement	75
Tableau 8	Variation du poids absolu PA (g) et du poids relatif PR (g/100g de poids corporel) des organes (foie, reins, cerveau et testicules) chez les rats témoins et rats traités après 21 jours de traitement	77
Tableau 9	Variation de quelques paramètres hématologiques chez les rats témoins et rats traités après 21 jours de traitement	83
Tableau 10	Variation de quelques paramètres biochimiques chez les rats témoins et rats traités après 21 jours de traitement	88
Tableau 11	Variation de glutathion (nmol/mg prot), de MDA (nmol/mg prot) et de l'activité enzymatique de la GPx (mol GSH/mg prot) dans les organes (Foie et rein) chez les rats témoins et rats traités après 21 jours de traitement	104
Tableau 12	Variation de glutathion (nmol/mg prot), de MDA (nmol/mg prot) et de l'activité enzymatique de la GPx (mol GSH/mg prot) dans les organes (cerveau et testicules) chez les rats témoins et rats traités après 21 jours de traitement	109

LISTE DES FIGURES

LISTE DES FIGURES

FIGURE	TITRE	PAGE
Figure 1	Mécanismes de production des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqué en biologie	07
Figure 2	Fuite d'électrons source de ROS au sein de la chaîne de transport d'électrons	09
Figure 3	Les différentes cibles des Espèces Réactives de l'Oxygène	11
Figure 4	Réactions de la peroxydation lipidique	12
Figure 5	Lésions de l'ADN formées par attaque radicalaire du patrimoine génétique des cellules	14
Figure 6	Représentation schématique des mécanismes de défenses enzymatiques antioxydantes	17
Figure 7	Formule semi-développée du glutathion réduit (GSH)	19
Figure 8	Structure chimique de l'alpha-tocophérol ou vitamine E	21
Figure 9	Structure du β -carotène	21
Figure 10	Structure de l'acide L-ascorbique	22
Figure 11	Différentes pathologies associées au stress oxydant	23
Figure 12	Structure du noyau phénol	24
Figure 13	Structure générale du noyau des flavonoïdes	25
Figure 14	Quelques flavonoïdes	25
Figure 15	Acides phénoliques, squelette benzoïque (I) et squelette cinnamique (II)	27
Figure 16	Structure d'un stilbène, le resvératrol	27
Figure 17	Structure et numérotation des atomes de carbone du phénylpropane (1) et des lignanes (2) (liaison β - β' ou 8,8')	28
Figure 18	Schéma général de biodisponibilité des polyphénols	29
Figure 19	Flavonoïdes et leurs sites proposés pour la chélation des ions métalliques	32
Figure 20	Nomenclature des cycles et numérotation systématique des hydroxyles de la quercétine	34
Figure 21	Formule de la vanilline	38
Figure 22	Structures chimiques des principales familles des pesticides	43

TABLES DES ILLUSTRATIONS

Figure 23	Processus de diffusion des pesticides dans l'environnement	44
Figure 24	Modes d'exposition de l'homme et des milieux par les pesticides	46
Figure 25	Structure chimique de métribuzine	49
Figure 26	Schéma récapitulatif du protocole expérimental	56
Figure 27	La gamme d'étalonnage utilisée (BSA 1mg/ml) pour le dosage des protéines	70
Figure 28	Variation du poids corporel (g) des rats témoins et rats traités après 21 jours de traitement	76
Figure 29	Evolution du poids relatif du foie (g/100 g Pc) chez les rats témoins et rats traités après 21 jours de traitement	78
Figure 30	Evolution du poids relatif des reins (g/100 g Pc) chez les rats témoins et rats traités après 21 jours de traitement	79
Figure 31	Evolution du poids relatif du cerveau (g/100 g Pc) chez les rats témoins et rats traités après 21 jours de traitement	79
Figure 32	Evolution du poids relatif du cerveau (g/100 g Pc) chez les rats témoins et rats traités après 21 jours de traitement	79
Figure 33	Variation des globules rouges (10^6 /ul) chez les rats témoins et rats traités après 21 jours de traitement	82
Figure 34	Variation d'hématocrite (%) chez les rats témoins et rats traités après 21 jours de traitement	84
Figure 35	Variation d'hémoglobine (g/dl) chez les rats témoins et rats traités après 21 jours de traitement	84
Figure 36	Variation du volume globulaire moyen (fl) chez les rats témoins et rats traités après 21 jours de traitement	84
Figure 37	Variation de la concentration sérique en glucose (mg/dl) chez les rats témoins et rats traités après 21 jours de traitement	89
Figure 38	Variation de la concentration sérique en bilirubine totale (mg/l) chez les rats témoins et rats traités après 21 jours de traitement	89
Figure 39	Variation de la concentration sérique en urée (mg/dl) chez les rats témoins et rats traités après 21 jours de traitement	89
Figure 40	Variation de la concentration sérique en créatinine (mg/dl) chez les rats témoins et rats traités après 21 jours de traitement	91
Figure 41	Variation de la concentration sérique en cholestérol (g/l) chez les	91

TABLES DES ILLUSTRATIONS

	rats témoins et rats traités après 21 jours de traitement	
Figure 42	Variation de la concentration sérique en triglycérides (g/l) chez les rats témoins et rats traités après 21 jours de traitement	91
Figure 43	Variation de la concentration sérique en protéines totales (g/l) chez les rats témoins et rats traités après 21 jours de traitement	93
Figure 44	Variation de l'activité enzymatique de la phosphatase alcaline (UI/L) chez les rats témoins et rats traités après 21 jours de traitement	93
Figure 45	Variation de l'activité enzymatique de l'AST (UI/L) chez les rats témoins et rats traités après 21 jours de traitement	94
Figure 46	Variation de l'activité enzymatique de l'ALT (UI/L) chez les rats témoins et rats traités après 21 jours de traitement	94
Figure 47	Taux du glutathion réduit (GSH), de glutathion peroxydase (GPx) et de malondialdéhyde (MDA) hépatiques chez les rats témoins et rats traités après 21 jours de traitement	105
Figure 48	Taux du glutathion réduit (GSH), de glutathion peroxydase (GPx) et de malondialdéhyde (MDA) rénales chez les rats témoins et rats traités après 21 jours de traitement	106
Figure 49	Taux du glutathion réduit (GSH), de glutathion peroxydase (GPx) et de malondialdéhyde (MDA) cérébraux chez les rats témoins et rats traités après 21 jours de traitement	110
Figure 50	Taux du glutathion réduit (GSH), de glutathion peroxydase (GPx) et de malondialdéhyde (MDA) testiculaires chez les rats témoins et rats traités après 21 jours de traitement	111
Figure 51	Coupes histologiques du foie de rat témoin et rats traités après 21 jours de traitement	113
Figure 52	Coupes histologiques du rein de rat témoin et rats traités après 21 jours de traitement	114

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ABRÉVIATIONS

$\cdot\text{NO}_2$:	Dioxyde d'azote
$^1\text{O}_2$:	Oxygène singulet
4-HNE	:	4-hydroxy-2-nonéal
AchE	:	Acétylcholinestérase
BSA	:	Sérum albumine bovine
CAT	:	Catalase
CCMH	:	Concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine
ClO^-	:	Ion hypochlorite
Cu/Zn-SOD	:	Superoxyde dismutase aux ions cuivre et zinc
DL50	:	Dose létale 50
DTNB	:	Acide 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoïque) ou réactif d'Ellman
EDTA	:	Ethylène diamine tétra-acétique
ERO	:	Espèces réactives de l'oxygène
G6PDH	:	Glucose-6-phosphate déshydrogénase
Gamma-GT	:	Gamma glutamyl-transférase
GB	:	Globules Blancs
GR	:	Globules Rouges
GR	:	Glutathion réductase
GSH	:	Glutathion réduit

LISTE DES ABRÉVIATIONS

GSSG	:	Disulfure de glutathion (Glutathion oxydé)
H₂O₂	:	Peroxyde d'hydrogène
Hb	:	Hémoglobine
HO₂[·]	:	Hydroperoxyde
LOO[·]	:	radical peroxyde
MDA	:	Malondialdéhyde
Mn-SOD	:	Superoxyde dismutase
Mtz	:	Métribuzine
NO[·]	:	Monoxyde d'azote
O₂^{·-}	:	Radical superoxyde
O₂²⁻	:	Anion peroxyde
O₃	:	Ozone
OH[·]	:	Radical hydroxyle
ONOO⁻	:	Peroxynitrite
ONOO[·]	:	Peroxynitrite
Que	:	Quercétine
RL	:	Radical libre
RO[·]	:	Alkoxyde
RO₂[·]	:	Peroxyde
ROO⁻	:	Radical peroxyde
ROOH	:	Hydroperoxyde

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ROS	:	Reactive oxygen species
SOD	:	Superoxyde dismutase
TBA	:	“2-Thiobarbituric acid”: L’acide thiobarbiturique
TBARS	:	substances réagissant avec l'acide thiobarbiturique
TCA	:	Trichloroacétique
VGM	:	Volume globulaire moyen des hématies

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

<i>INTRODUCTION</i>	01
<i>CHAPITRE I. Stress oxydant :</i>	
1. Radicaux libres	04
1.1. Généralité sur les radicaux libres	04
1.2. Les radicaux libres biologiques	04
2. Définition du stress oxydant	05
3. Mécanismes de production des principales ERO	06
3.1. L'anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$	06
3.2. Le peroxyde d'hydrogène H_2O_2	06
3.3. Le radical hydroxyle HO^{\cdot}	07
3.4. L'oxygène singulet 1O_2	08
4. Sources des ERO ou ROS	08
4.1. Sources endogènes	08
4.2. Sources exogènes	10
5. Cibles biologiques des ROS	11
5.1. Peroxydation lipidique	11
5.2. Oxydation des protéines	13
5.3. Oxydation de l'ADN	13
6. Antioxydants	14
6.1. Définition	14
6.2. Mode d'action des antioxydants	15
6.3. Les systèmes de défense antioxydants	15
6.3.1. Les systèmes antioxydants enzymatiques	15
6.3.2. Les systèmes antioxydants non enzymatiques	18
6.3.2.1. Antioxydants non enzymatiques endogène	18
6.3.2.2. Antioxydants non enzymatiques exogènes	20
7. Les maladies liées au stress oxydant	22
<i>CHAPITRE II. Polyphénols en tant qu'antioxydants:</i>	
1. Présentation générale sur les polyphénols	24
1.1. Diversité structurale, sources alimentaires et classification des polyphénols	24
1.2. Pharmacocinétique et biodisponibilité des polyphénols	28

1.2.1 Absorption	28
1.2.2. Conjugaison	29
1.2.3. Transport plasmatique	30
1.2.4. Distribution dans les tissus et organes	30
1.2.5. Excrétion	30
1.3. Propriétés biologiques des polyphénols	31
1.3.1. Activité antioxydante des polyphénols	31
1.3.1.1. Piégeage direct de radicaux libres	31
1.3.1.2. Chélation des ions métalliques	32
1.3.1.3. Inhibition enzymatique	32
1.3.2. Les polyphénols: une action pro-oxydante ?	33
2. La quercétine et la vanilline – deux molécules modèles	33
2.1. Quercétine	34
2.1.1. Description et propriétés physico-chimiques	34
2.1.2. La biodisponibilité de la quercétine	35
2.1.3. Effets physiologiques de la quercétine	36
2.2. Vanilline	37
2.2.1. Origine	37
2.2.2. Propriétés physicochimiques	38
2.2.3. Etude toxicologique	38
2.2.4. Les propriétés physiologiques de la vanilline	39
 CHAPITRE III. Pesticides :	
1. Définition et utilisation	41
2. Classification	42
3. Mode d'action des pesticides	43
4. Impacts des pesticides sur l'environnement et la santé humaine	43
4.1. Effets sur l'environnement	43
4.2. Effets sur la santé	45
5. Le pesticide étudié : la métribuzine	48
5.1. Présentation	48
5.2. Utilisation et mode d'action	49
5.3. Propriétés physico-chimiques	50
5.4. Devenir dans l'environnement	51

5.5. Mode d'action et toxicité de la métribuzine	51
--	----

PARTIE PRATIQUE***CHAPITRE I. MATÉRIEL ET MÉTHODES :***

1. Matériel biologique et conditions d'élevage	53
2. Méthodes	53
3. Sacrifices et prélèvements des organes	55
3.1. Prélèvement sanguin	55
3.2. Prélèvement des organes	55
4. Méthodes de dosage des paramètres biochimiques	57
4.1. Dosage du glucose	57
4.2. Dosage de la bilirubine totale	58
4.3. Dosage de l'urée	59
4.4. Dosage de la créatinine	60
4.5. Dosage du cholestérol	61
4.6. Dosage des triglycérides	62
4.7. Dosage des protéines totales	64
4.8. Dosage des transaminases	65
4.8.1. Dosage de l'aspartateaminotransférase (AST)	65
4.8.2. Dosage d'Alanine aminotransférase (ALT)	66
4.9. Dosage de la phosphatase alcaline (PAL)	67
5. Dosage des paramètres du stress oxydant	68
5.1. Préparation de l'homogénat	68
5.2. Dosage du glutathion réduit (GSH)	68
5.3. Dosage des protéines	69
5.4. Dosage de malondialdéhyde (MDA)	70
5.5. Dosage de l'activité de la GPx	71
6. Etude histologique	72
7. Analyse statistique des résultats	74

CHAPITRE II. RÉSULTATS ET DISCUSSION :

1. Paramètres de croissance	75
1.1. Action sur la croissance corporelle	75
1.2. Action sur les poids relatif et absolu de certains organes	76

TABLE DES MATIÈRES

1.2.1. Foie	76
1.2.2. Reins	76
1.2.3. Cerveau	78
1.2.4. Testicules	78
2. Effets sur la fonction hématologique	82
3. Etude des paramètres biochimiques	87
3.1. Glucose	87
3.2. Bilirubine totale	87
3.3. Urée	87
3.4. Créatinine	90
3.5. Cholestérol	90
3.6. Triglycérides	90
3.7. Protéines totales	92
3.8. Phosphatase alcaline	92
3.9. Transaminases	92
4. Évaluation des marqueurs du stress oxydatif dans certains organes	102
4.1. Foie	102
4.2. Reins	103
4.3. Cerveau	107
4.4. Testicules	108
5. Etude histologique	112
5.1. Foie	112
5.2. Reins	112
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	118
BIBLIOGRAPHIE	121
ANNEXES	161

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

INTRODUCTION

Introduction

Les problèmes posés par la dispersion de polluants dans l'environnement ont suscité l'intérêt de la communauté scientifique depuis maintenant de nombreuses décennies. La prise de conscience de la nécessité de préserver les écosystèmes terrestres et aquatiques a ainsi fait émerger certaines questions, notamment celles du devenir de ces polluants dans l'environnement ainsi que de leurs effets sur les communautés animales et végétales.

Parmi les contaminants majeurs de l'environnement, les pesticides posent de sérieux problèmes écologiques et sanitaires (Mengistie et al., 2016). Leur immense succès dans les applications agricoles afin d'optimiser la productivité des denrées, a entraîné une étendue rapide de leur production et utilisation. Mais, vu leurs propriétés toxicologiques, ubiquité, persistance, présence et concentration dans la chaîne alimentaire, ils constituent un véritable danger, et sont actuellement considérés parmi les principaux polluants environnementaux, à l'origine de résidus toxiques dans l'air, le sol et l'eau (Li et al., 2014 ; Jayaraj et al., 2016 ; Souza et al., 2017).

Bien qu'utilisés contre des organismes cibles particuliers, les pesticides sont susceptibles d'exercer une activité toxique vis-à-vis d'autres organismes dits non-cibles (Maroni et al., 2000; Eason et O'Halloran, 2002). Par conséquent, et face à cette dualité bénéfice-risque, la protection de la santé humaine contre l'exposition aux pesticides demeure une préoccupation majeure, et le problème de résidus toxiques reste d'actualité.

Les effets potentiellement néfastes des pesticides sur les espèces non ciblées font l'objet d'un large consensus. Ainsi, les principaux effets chroniques relevés sont les troubles des systèmes nerveux central (Steeve et al., 2013 ; Sharma et al., 2014 ; Galal et al., 2014 ; Andrea Rother, 2014) et immunitaire (Baconi et al., 2013 ; Badgular et al., 2013 ; Thakur et al., 2013 ; Kumar et al., 2015), les effets perturbateurs endocriniens (Memon et al., 2014 ; Khedr Nassar, 2016) et les cancers (Héritier et al., 2014 ; Zare et al., 2015).

A ce jour, ces études n'ont pas cessé et sont à l'origine de nombreux documents de référence (Rezaie Agdam et al., 2017 ; Jamal et al., 2016 ; Mehri et al., 2016 ; Abdel-Ghany et al., 2016), démontrant la complexité des mécanismes toxicologiques mis en jeu. Néanmoins, les résultats obtenus par le biais de ces études concluent que les pesticides incluant les herbicides, les insecticides et les fongicides sont des molécules pro-oxydantes dans la mesure où elles engendrent une surproduction d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) dans les cellules de l'organisme qui y est exposé.

Du fait de leur très grande réactivité, ces dérivés de l'oxygène (ROS) peuvent réagir avec la plupart des composés cellulaires (lipides membranaires, les protéines ou l'ADN), entrainer ainsi des dommages cellulaires et tissulaires (Valavanidis et al., 2006). Toutefois, une régulation très fine de la production et de la dégradation des ROS est réalisée dans les cellules (Lushchak, 2011 ; Islas-Flores et al., 2013).

En fait, pour se protéger des effets toxiques du ROS, l'organisme a développé des systèmes de défense contre ces toxiques ou acquiert les antioxydants de l'alimentation. Ces systèmes comprennent des enzymes qui catalysent la réduction des ROS (e.g. catalase, superoxydes dismutases ou glutathion peroxidases), et des molécules non enzymatiques qui les neutralisent (e.g. glutathion réduit, acide ascorbique, vitamine E et polyphénols) (Bouayed, 2010 ; Lushchak, 2011 ; Regoli et Giuliani, 2014).

Cependant, les pesticides peuvent altérer le fonctionnement des systèmes de contrôle (inhibition de l'ensemble des enzymes et déplétion de la quantité de glutathion), et être à l'origine d'un stress cellulaire appelé stress oxydant, comme cela est décrit dans de nombreuses études concernant la toxicité des pesticides chez l'homme (Medjdoub et al., 2011 ; Balaji et al., 2012) et les rongeurs (Sidhu et al., 2014 ; Heikal et al., 2014 ; Ojo et al., 2014 ; Sief et al., 2015 ; Vara Prasad et al., 2016), en particulier. En réponse au stress oxydant, ces études ont également montré que les pesticides peuvent affecter de nombreux processus physiologiques, traduits en changements fonctionnels ou lésionnels (morphologie) d'un ou de plusieurs organes comme le foie (Seif et al., 2015), les reins (Seif et al., 2015 ; Vara Prasad et al., 2016), le cerveau (Ojo et al., 2014) et les testicules (Heikal et al., 2014).

Pour prévenir ce type de situations, la recherche sur la supplémentation en antioxydants a été le sujet de plusieurs études (Kim et al., 2013 ; Shati, 2014 ; Mehrpak et al., 2015 ; Ibrahim Elsayed et al., 2015), qui ont montré qu'un apport exogène en antioxydants peut réduire les dommages induits par le stress oxydatif. Ces antioxydants sont apportés chez l'homme à travers la consommation de fruits et légumes ou d'autres boissons à base de plante et peuvent s'avérer utiles pour la santé humaine (Shebis et al., 2013).

A ce titre, les polyphénols, particulièrement abondants dans une alimentation riche en produits végétaux, pourraient jouer un rôle protecteur important qui a été attribué, en partie, à leur potentiel antioxydant (Ibrahim Elsayed et al., 2015 ; Olayinka et al., 2015 ; Nagendra Kumar et al., 2016 ; Al-Shaabi et al., 2016). Ces composés issus du métabolisme secondaire des plantes sont, en effet, connus pour leur capacité à piéger les espèces réactives d'oxygène.

Bien plus, ils ont une multitude d'activités biologiques dépendant de leurs structures chimiques. Plus de 8000 structures ont été identifiées, les polyphénols constituent une importante famille d'antioxydants présents dans les végétaux (Działo et al., 2016).

À partir de ces connaissances, il serait donc intéressant d'étudier l'effet d'un apport exogène en polyphénols sur le stress oxydant induit par les pesticides. L'objectif de notre travail est d'évaluer la toxicité induite par un herbicide, la métribuzine chez le rat et de tester les effets modulateurs de la supplémentation en polyphénols (la quercétine ou la vanilline).

Il est donc possible d'analyser l'impact de la métribuzine chez les rats par le biais de différents biomarqueurs d'effet. Parmi ceux-ci peuvent notamment être cités les marqueurs enzymatiques et non enzymatiques de stress oxydant ; les modifications de paramètres hématologiques ; biochimiques ou encore de paramètres de croissance (poids corporel et poids relatif des organes). Nous avons également recherché des effets histologiques (variation de structure) au niveau de certains tissus cibles (foie et reins).

Afin de présenter l'étude menée en ce sens, le présent manuscrit s'articule en deux parties : l'une bibliographique, l'autre expérimentale.

Dans la partie bibliographique, le premier chapitre est une revue de littérature introduisant le concept du stress oxydant. Les sources des ROS et leurs conséquences biologiques sont abordées dans un premier temps. Les antioxydants endogènes et exogènes, sont ensuite présentés. Le second chapitre est quant à lui dédié à la présentation des polyphénols en général et des polyphénols sélectionnés (quercétine et vanilline) en particulier: structures et propriétés, capacité antioxydante, biodisponibilité et effet santé. Enfin, les connaissances sur l'utilisation et les effets de l'ensemble des pesticides agricoles, et du pesticide étudié (métribuzine) fait l'objet de la troisième chapitre.

La partie expérimentale débute avec la présentation de la démarche entreprise qui tient lieu de préambule au chapitre « Matériels et Méthodes » proprement dit. Les chapitres « Résultats et Discussion » sont ensuite exposés avant de dresser un bilan de ces travaux au travers d'une conclusion générale et de présenter les perspectives d'études sur lesquelles ces travaux seraient susceptibles de déboucher.

CHAPITRE I. STRESS OXYDANT

I. Stress oxydant

1. Radicaux libres

1.1. Généralité sur les radicaux libres

Un radical libre (RL) est une entité chimique (atome, molécule ou fragment de molécule) capable d'exister sous forme indépendante, et contenant au moins un électron célibataire ou non apparié sur sa couche électronique externe (Bonfont-Rousselot et al., 2003 ; Finaud et al., 2006). Cette propriété lui confère une grande instabilité et par-là même une extrême réactivité chimique (Halliwell et Gutteridge, 1992). De ce fait, les radicaux libres doivent donner un électron non apparié ou arracher un électron à une molécule avoisinante, afin de tendre vers un état moins excité, donc plus stable (Fang et al., 2002).

Les réactions de transfert d'électrons qu'ils produisent (réactions d'oxydoréduction, redox) conduisent souvent à la formation d'un nouveau radical, ce phénomène pouvant se propager par des réactions en chaîne (Carriere et al., 2006). La durée de vie des radicaux libres est extrêmement très courte de la nano à la milliseconde, et il est symbolisé par un point qui indique où l'électron libre se situe (Goto et al., 2008).

1.2. Les radicaux libres biologiques

En biologie, les radicaux libres sont formés le plus souvent par gain d'électron à partir de l' O_2 (Droge, 2002). Les radicaux dérivés d'oxygène représentent, en effet, la classe la plus importante d'espèces radicalaires générées dans les systèmes vivants à cause de l'importance de leur métabolisme aérobie (Valko et al., 2007). Cependant, d'autres espèces radicalaires sont encore à considérer, à savoir les espèces réactives de l'azote (Palmer et al., 1988).

Parmi toutes les espèces radicalaires susceptibles de se former dans les cellules, il convient de distinguer (Favier, 2003) :

* **Des radicaux primaires**, dérivent de l'oxygène par des réductions à un électron tel anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$, et le radical hydroxyle OH^{\cdot} ; ou de l'azote tel le monoxyde d'azote NO^{\cdot} .

* **Des radicaux secondaires**, se forment par réaction de ces radicaux primaires sur les composés biochimiques de la cellule.

* **D'autres espèces dérivées de l'oxygène**, dites espèces actives de l'oxygène comme l'oxygène singulet 1O_2 , le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou le nitroperoxyde (ONOOH), ne sont pas des radicaux libres, mais sont aussi réactives et peuvent être des précurseurs de radicaux.

L'ensemble des radicaux libres et de leurs précurseurs est souvent appelé espèces réactives de l'oxygène (ERO), ou de l'anglais reactive oxygen species (ROS) (tab.1)

Tableau 1: Principales ERO radicalaires et non-radicalaires (Halliwell et Whiteman, 2004)

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

Toutes ces espèces oxygénées sont produites par divers mécanismes physiologiques car elles sont utiles pour l'organisme à dose raisonnable (Favier, 2003). En fait, les espèces réactives de l'oxygène (ERO) protègent, régulent la cellule et permettent de maintenir une certaine homéostasie de l'état redox de l'organisme (Dikalov et al., 2007). Cependant, les ERO provoquent des dommages cellulaires si elles sont produites d'une manière incontrôlée (Kim et al., 2009).

Leur hyperréactivité les engage dans des réactions de dénaturation des constituants cellulaires de type peroxydation avec les glucides, les lipides, les protéines et l'ADN (Curtay et Robin, 2000). De ce fait, ces entités oxydantes sont physiologiquement maintenues en équilibre par de nombreux systèmes antioxydants (Sies, 1991).

2. Définition du stress oxydant

Ce type de stress est généré par l'accumulation des espèces réactives de l'oxygène (ERO) au niveau cellulaire (Beckman et Ames, 1998). Comme cité précédemment, une accumulation excessive de radicaux libres pouvant engendrer des dommages importants sur la structure et le métabolisme cellulaire (Halliwell et Cross, 1994). La conséquence des effets nocifs des RL et des métabolites réactifs est dite « stress oxydant » (Barouki, 2006 ; Jenkins et al., 2007).

Ce terme est défini comme un déséquilibre entre les processus biochimiques de production des ERO et ceux qui sont responsables de leur contrôle et élimination (Bloomer et Fisher-Wellman, 2008 ; Browne et al., 2008 ; Powers et al., 2010). Ce déséquilibre peut se produire quand le système de défense antioxydant est surmené par l'augmentation des oxydants

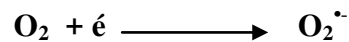
ou lorsque les défenses sont affaiblies par une carence d'apport et/ou de production d'antioxydants (Kirschvink et al., 2008). L'équilibre ou l'homéostasie redox est alors perturbé et les cellules deviennent vulnérables aux attaques par les ERO (Mac Laren, 2007).

3. Mécanismes de production des principales ERO

Parmi les EROs, on peut distinguer quatre espèces principales (fig.1) : l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), le radical hydroxyle (OH^{\cdot}) et l'oxygène singulet (1O_2) :

3.1. L'anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$

L'anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$ constitue le précurseur de la plupart des ERO et induit les réactions oxydatives en chaîne (Abele et al., 2002). C'est l'espèce la plus couramment générée par la cellule, par réduction d'une molécule d' O_2 (Wolin, 1996). A l'état fondamental, l' O_2 est une molécule biradicalaire formée de deux atomes présentant sur leurs orbitaux externes deux électrons non appariés (Sies, 1993 ; De Leiris, 2003). En présence d'une quantité d'énergie suffisante, la molécule d'oxygène peut acquérir un électron supplémentaire et former ainsi l'anion superoxyde (Bisbal et al., 2010).



Les radicaux superoxydes ($O_2^{\cdot-}$) ne sont pas très réactifs, mais constituent des précurseurs d'autres espèces plus réactives. La faible réactivité de ces radicaux permet d'ailleurs leur utilisation par l'organisme comme médiateurs régulant des fonctions biologiques (Favier, 2003).

3.2. Le peroxyde d'hydrogène H_2O_2

Le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 (appelé également eau oxygénée) est formé par l'addition d'un second électron sur l' $O_2^{\cdot-}$ donnant comme intermédiaire l'anion peroxyde O_2^{2-} , qui se protone facilement pour donner H_2O_2 . Toutefois, la principale production de H_2O_2 résulte de la dismutation de l' $O_2^{\cdot-}$ selon la réaction suivante (Daum-Badouard, 2006):



L'absence de charge à sa surface rend cette ERO très lipophile et peu réactif en milieu aqueux (Cash et al., 2007). Contrairement à l'anion superoxyde, le peroxyde d'hydrogène est donc capable de traverser les membranes des cellules et des organites cellulaires pour engendrer des dommages loin de son site de production (Halliwell et Gutteridge, 1996).

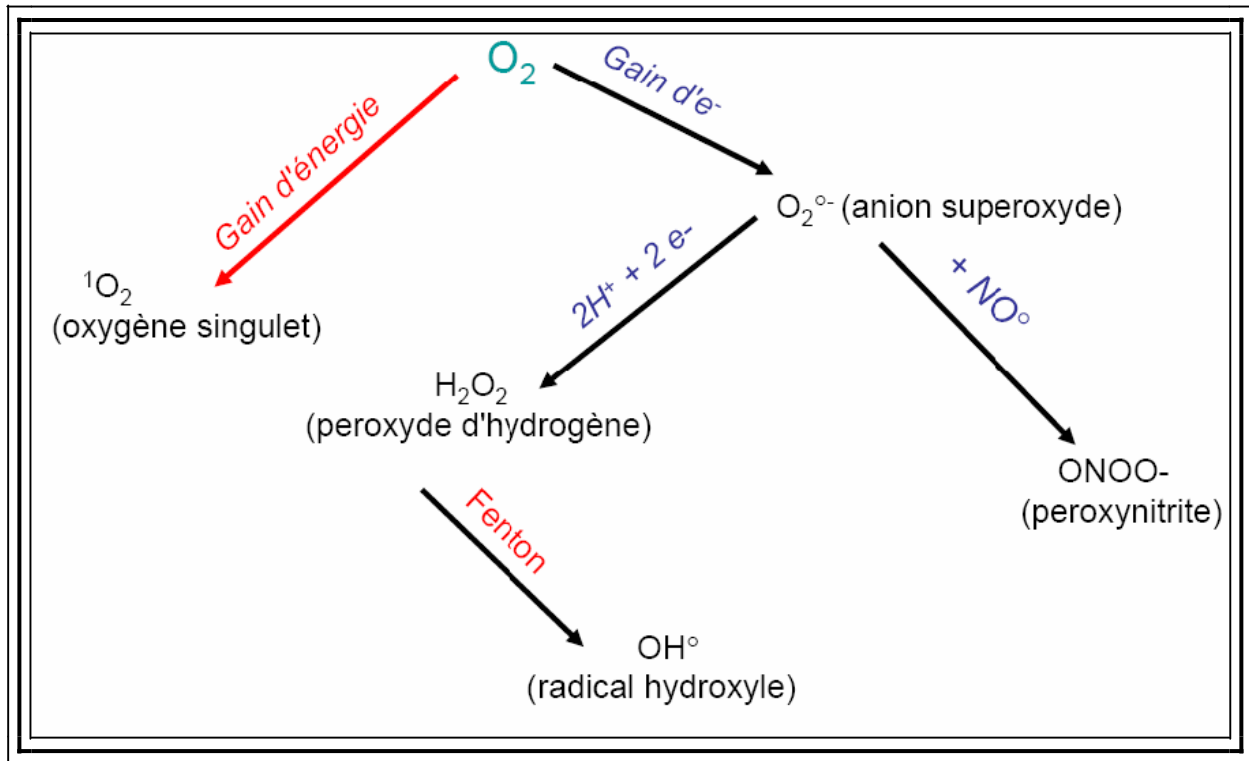
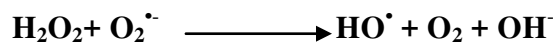


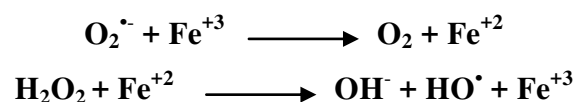
Figure 1 : Mécanismes de production des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l’oxygène impliqué en biologie (Behrend et al., 2003).

3.3. Le radical hydroxyle HO[•]

Le radical hydroxyle, est généré par la réaction du peroxyde d’hydrogène avec l’anion superoxyde (réaction d’Haber-Weiss), engendrant alors un ion OH⁻ inoffensif et un radical hydroxyle HO[•] (Comhair et Erzurum, 2002).



Cette réaction est lente et probablement inopérante dans les tissus vivants. Mais, en revanche, en présence de métaux de transition (fer, cuivre), l’H₂O₂ donne naissance in vivo via la réaction de Fenton à un radical hydroxyle HO[•] hautement réactif (Goldstein et al., 1993).



Le radical hydroxyle à une demi-vie extrêmement courte et une capacité à diffuser restreinte, il est capable de réagir très rapidement avec la plupart des molécules biologiques

comme l'ADN, les protéines, les sucres et les lipides membranaires (Delattre et al., 2005), en transformant la molécule cible en radical libre très réactif. Ce radical nouvellement formé peut alors interagir avec d'autres molécules cibles déclenchant ainsi des réactions en chaîne.

Les réactions en chaîne représentent l'un des plus grands dangers du radical OH^\bullet . En revanche, H_2O_2 et $\text{O}_2^{\bullet-}$ ne sont pas suffisamment réactifs pour déclencher des réactions en chaîne (Lau et al., 2008; Aprioku, 2013). Le radical hydroxyle apparaît donc comme l'espèce réactive ayant une responsabilité majeure dans la cytotoxicité des radicaux libres (Guetteridge, 1993).

3.4. L'oxygène singulet $^1\text{O}_2$

L'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$), une autre espèce réactive de l'oxygène, est principalement produite dans le vivant suite à une exposition à des rayons lumineux (Freinbichler et al., 2011), où une molécule excitée transfère son énergie à l'oxygène et l'active en oxygène singulet. $^1\text{O}_2$ est très réactif et peut par exemple s'additionner rapidement sur des doubles liaisons carbone-carbone (Yoshikawa et al., 2000). Il a pour cible biologique les membranes, les acides nucléiques et les protéines.

Toutefois, il existe d'autres ERO tel que le monoxyde d'azote (NO^\bullet), qui a un rôle dans de multiples fonctions physiologiques (De Backer, 2006). Mais, à forte concentration, le NO devient délétère pour les cellules notamment en réagissant avec $\text{O}_2^{\bullet-}$ pour former un puissant oxydant le peroxynitrite (ONOO^\bullet), qui peut secondairement se décomposer en d'autres oxydants comme $^\bullet\text{NO}_2$ et le OH^\bullet (Densiov et Afanas'ev, 2005).

4. Sources des ERO ou ROS

Les RL sont produits dans l'organisme par de nombreux mécanismes tant endogènes qu'exogènes (Halliwell, 2006).

4.1. Sources endogènes

Les ERO produits d'une manière endogène proviennent essentiellement du métabolisme mitochondrial (Pattwell et Jackson, 2004), du peroxyosome (Boveris et al., 1972) et du réticulum endoplasmique (De et Baudhuin, 1966).

- *Mitochondrie*

La mitochondrie est considérée comme une des principales sources de ROS dans la cellule par l'intermédiaire de sa chaîne respiratoire. Elle produirait, en effet, 90% des ROS cellulaires

(Balaban et al., 2005). Cette production centralisée de ROS est due au fait que la mitochondrie est le lieu central de consommation de l'oxygène au cours de la phosphorylation oxydative (Qutub et Popel, 2008).

Cet organe produit la majeure partie de l'énergie cellulaire grâce aux processus de phosphorylation oxydative où l'oxydation de divers substrats métaboliques (tels les glucides et les acides gras en particulier) produit de l'eau et de l'adénosine triphosphate (ATP), avec l'oxygène (O₂) comme accepteur final d'électrons (Nicholls et Ferguson, 2002).

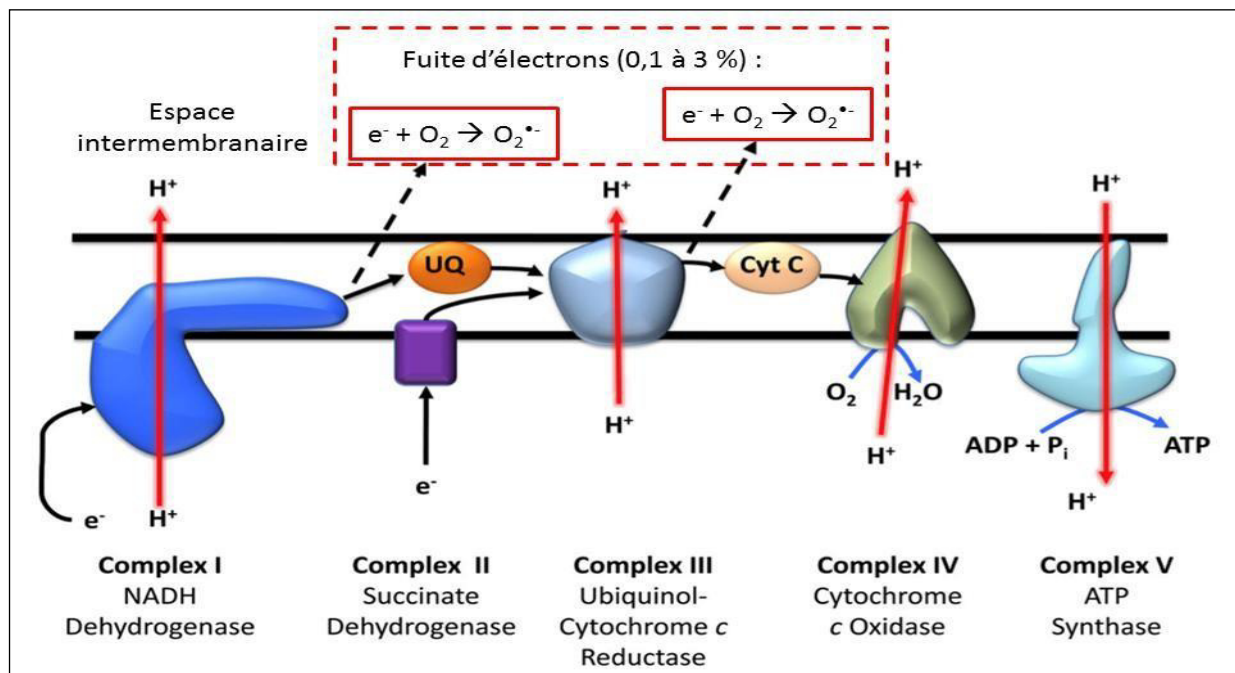


Figure 2: Fuite d'électrons source de ROS au sein de la chaîne de transport d'électrons

(D'après Ghoulé et al., 2011)

(UQ : Ubiquinone ; Cyt C : Cytochrome C)

La réduction de l'oxygène en eau nécessite l'apport de quatre électrons (Beckman et Ames, 1998). Or, des réductions à un seul électron, produisant des anions superoxyde, peuvent aussi survenir (Abele et al., 2002). Cette réduction partielle d'oxygène dans la mitochondrie est due à la fuite d'électrons dans la chaîne respiratoire qui a lieu dans la membrane interne mitochondriale (fig.2).

Cette fuite se produit principalement au niveau des complexes I (NADH deshydrogénase) et III (ubiquinone – cytochrome c réductase), et mène à la production du radical superoxyde ($O_2^{\bullet-}$), le précurseur des ROS (Turrens, 1997; McLennan et Degli Esposti, 2000).

Selon les sources, cette fuite d'électrons représente entre 0,1 et 3% du flux total de la chaîne respiratoire (Beckman et Ames, 1998).

- ***Peroxisomes***

Les peroxysomes sont des organites intracellulaires catalysant des réactions essentielles pour la cellule comme la bêta-oxydation de certains acides gras et l'alpha-oxydation de l'acide phytanique. Toutes ces réactions d'oxydation conduisent à la production de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), neutralisé ensuite par la catalase peroxysomale (enzyme antioxydante) afin de réaliser des réactions de peroxydation d'autres substrats (Schrader et Fahimi, 2004). Ces réactions sont importantes dans le processus de détoxification présent dans le foie et le rein. Seule une faible quantité d' H_2O_2 produit au niveau du peroxysome pourrait échapper à la catalase (Dalle-Donne et al., 2006).

- ***Réticulum endoplasmique***

Le réticulum endoplasmique lisse contient des enzymes qui catalysent une série de réactions pour détoxifier les molécules liposolubles et d'autres produits métaboliques toxiques (Turrens et al., 1982 ; Freeman et al., 1983). La plus connue de ces enzymes est le cytochrome P450 qui oxyde les acides gras insaturés et les xénobiotiques, produisant ainsi des ROS (Morel et Barouki, 1999).

4.2. Sources exogènes

L'environnement dans lequel nous vivons tout comme notre mode de vie sont à l'origine d'une augmentation de la production de ROS dans notre organisme et sont générateurs du stress oxydant.

Les sources exogènes peuvent être représentées par des facteurs environnementaux, pollutions diverses, produits chimiques ainsi que des contaminations par des métaux lourds ou certaines carences nutritionnelles (Priyadarsini, 2005). Les nombreuses sources potentielles de ROS exogènes comprennent les radiations, les infections pathogènes, les herbicides, insecticides, les toxines, les UV et la fumée de cigarette (Kregel et Zhang, 2007).

5. Cibles biologiques des ROS

En plus des fonctions biologiques, la réactivité particulière des ROS ajoute des propriétés toxiques et diversifiées (Barouki, 2006 ; Valko et al., 2007). Le stress oxydatif dû aux radicaux libres, entraîne des dégâts tissulaires essentiellement (fig.3) par l’oxydation des protéines, de l’ADN ou des lipides (Laight et al., 2000).

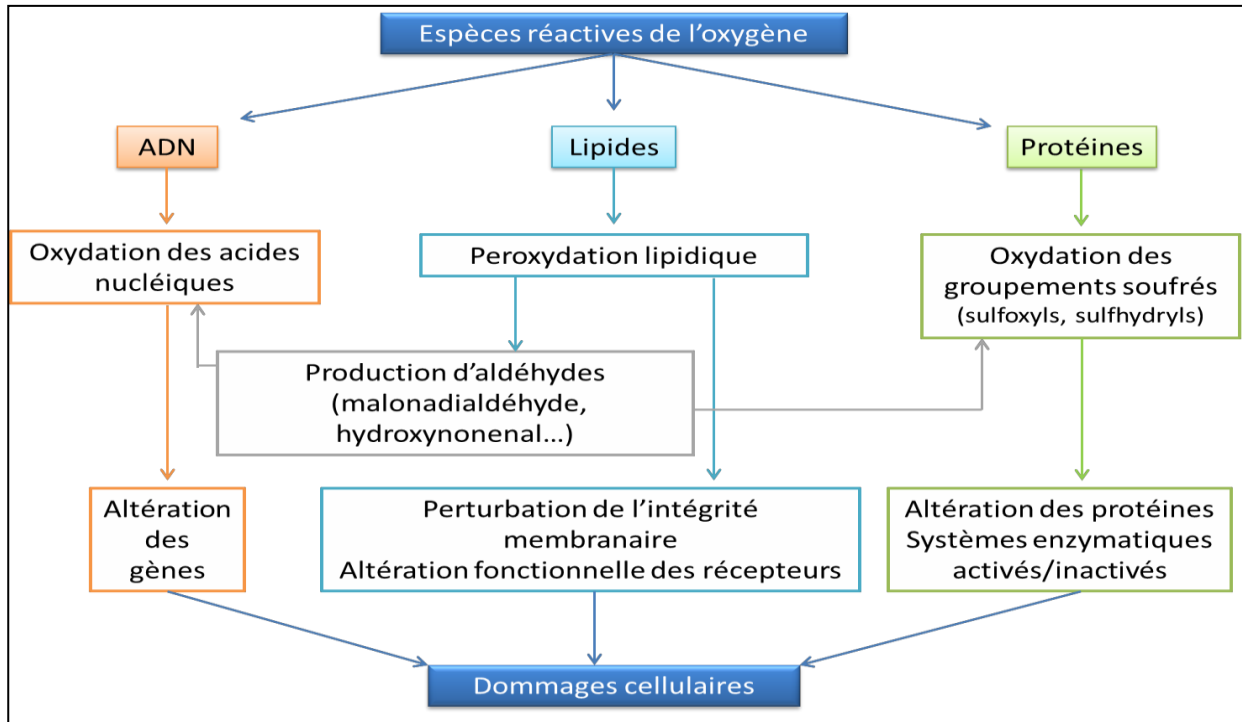


Figure 3 : Les différentes cibles des Espèces Réactives de l'Oxygène (D’après Monteil et al., 2004)

5.1. Peroxydation lipidique

Les premières cibles privilégiées de l’attaque radicalaire sont les lipides et principalement leur acides gras polyinsaturés, qui sont très sensibles à l’oxydation en raison de leur degré élevé d’insaturation (Pamplona et al., 2000 ; Hulbertl, 2005).

La peroxydation lipidique (fig.4) se déroule en trois phases :

❖ **L’initiation** : qui consiste en la rupture homolytique, occasionnée par un initiateur radicalaire (tel que le radical hydroxyle OH[•]), d’une liaison C-H de la chaîne d’un acide gras, ce qui en fait un composé radicalaire (diène conjugué) très réactif vis-à-vis de l’oxygène et qui va donc se transformer en radical peroxyde (LOO[•]).

❖ **La propagation** : au cours de laquelle le radical peroxyde va arracher un hydrogène à un autre acide gras, créant un nouveau radical et entretenant ainsi une réaction en chaîne, pour se transformer en hydroperoxyde.

❖ **La terminaison** : les hydroperoxydes peuvent subir plusieurs modes d'évolution, être réduits et neutralisés par la glutathion peroxydase et la vitamine E intercalée dans la bicouche lipidiques des membranes (Luc et al., 1991 ; Halliwell, 1996 ; Favier, 2003), ou continuer à s'oxyder et à se fragmenter en produits secondaires c'est-à-dire en aldéhydes très réactifs, pouvant être considérés comme des messages secondaires toxiques qui augmente les dommages initiaux dus aux radicaux libres (Marnett, 1999).

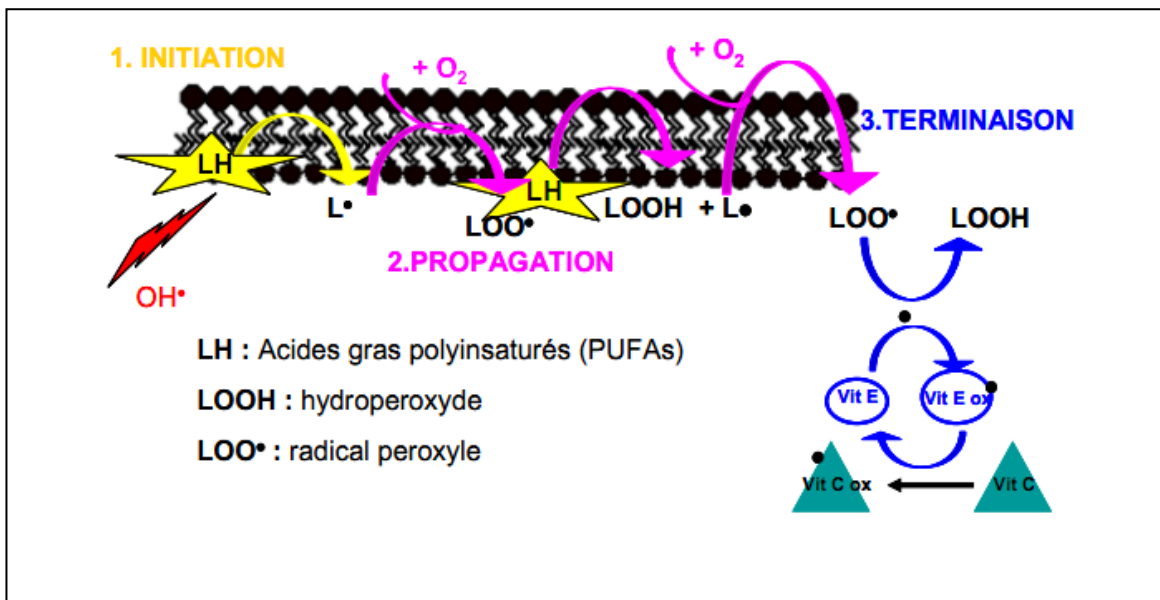


Figure 4 : Réactions de la peroxydation lipidique (Daum-Badouard, 2006)

Parmi les aldéhydes formés : l'isoprostane, le malondialdéhyde (MDA) et le 4-hydroxynonéal (4- HNE), sont très étudiés comme marqueurs de la peroxydation lipidique. Les deux derniers produits (MDA, 4HNE) réagissent avec les protéines et l'ADN, une fois fixé à la molécule d'ADN, le MDA semble être le produit le plus mutagène, alors que le 4-HNE est le plus toxique pour la cellule (Marnett, 1999).

La peroxydation lipidique est suivie d'un changement structural des membranes biologiques (Pacifi et al., 1994) ou d'autres éléments contenant des lipides (Niki et al. 2005; Stark , 2005 ; Al-Mutairi et al., 2007). Ces perturbations fonctionnelles peuvent aboutir à la mort des cellules (Bonnefont-Rousselot, 1994).

5.2. Oxydation des protéines

De façon comparable à l'oxydation des lipides, les protéines sont aussi susceptibles d'être oxydées par les ROS. Ces réactions d'oxydation, fréquemment influencées par les cations métalliques comme le Cu^{2+} et le Fe^{2+} , peuvent être classées en deux catégories : celles qui cassent les liaisons peptidiques et modifient la chaîne protéique et l'autres qui induire des modifications peptidiques par l'addition de produits issus de la peroxydation lipidique comme le 4-HNE. De telles modifications conduisent généralement à une perte de fonction catalytique ou structurale des protéines (Levine, 2002).

Les principaux marqueurs biologiques de l'oxydation des protéines sont les dérivés carbonylés. Ces derniers sont formés lorsque les espèces réactives de l'oxygène attaquent les résidues d'acides aminés (Levine, 2002).

5.3. Oxydation de l'ADN

Les modifications induites par des processus oxydatifs dans le matériel génétique appartiennent à quatre catégories (fig.5): modifications des bases, cassures simples et doubles de la chaîne d'ADN, site abasiques et pontage avec les protéines (Hochberg et al., 2006).

Les ROS ont une grande affinité de réaction avec certaines bases constitutives de l'ADN particulièrement la guanine. Celle-ci est facilement transformée en 8-hydroxy-2-déoxyguanosine (8-OHdG), qui est normalement éliminée par des enzymes de réparation de l'ADN. Si ces enzymes sont défaillantes, la (8-OHdG) s'accumulera au sein de l'ADN causant ainsi des mutations (Borek, 1997).

Les aldéhydes réactifs issus de la peroxydation lipidique dont le MDA et le 4- HNE peuvent s'ajouter au groupe amine des bases de l'ADN et constituer ainsi une autre catégorie de dégâts oxydatifs de l'ADN (Marnett, 1999 ; Nair et al., 1999).

La formation de pontages covalents entre ADN et les protéines peut modifier l'expression des gènes et avoir ainsi de lourdes conséquences biologiques pour la cellule (Hochberg et al., 2006).

La figure 5 illustre les différentes lésions possibles sur l'ADN :

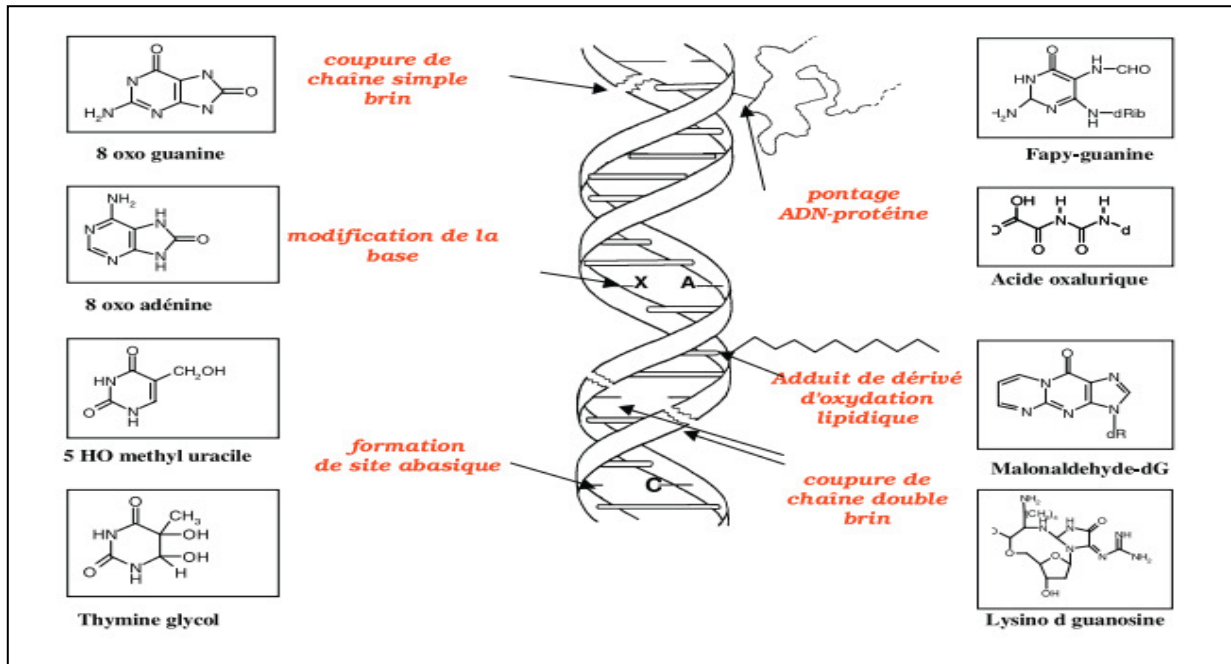


Figure 5 : Lésions de l’ADN formées par attaque radicalaire du patrimoine génétique des cellules (Favier, 2003)

6. Antioxydants

L’organisme a développé des systèmes de défense très efficaces contre la production des espèces réactives de l’oxygène (ERO). Les molécules contrôlant cette production sont désignées par le terme « Antioxydant ».

6.1. Définition

Du point de vue biologique, les antioxydants sont toute substance qui, présente à faible concentration par rapport à celle du substrat oxydable, retarde ou inhibe significativement l’oxydation de ce substrat, et dont les produits de réaction avec l’oxydant ne sont pas toxiques (Durackova et al., 2008).

Cette définition fonctionnelle s’applique à un grand nombre de substances, comprenant des enzymes aux propriétés catalytiques spécifiques, mais aussi aux petites molécules hydro- ou liposolubles (Delattre et al., 2005). Cette grande variété physico-chimique autorise la présence d’antioxydants dans tous organismes, qu’ils soient intracellulaire, membranaires ou extracellulaires (Cano et al., 2006).

6.2. Mode d'action des antioxydants

Indépendamment de leur localisation, les antioxydants peuvent agir à deux niveaux: en prévenant la formation de radicaux libres oxygénés ou en épurant les radicaux libres oxygénés. (Penna et al., 2009). En fait, en fonction de leur mécanisme d'action on distingue des antioxydants inhibiteurs des radicaux libres, décomposeurs des peroxydes, désactivateurs des ions métalliques, ou des piègeurs d'oxygènes (Dziezak, 1986; Yagi, 1970). En complément de ces mécanismes, l'organisme est en outre capable de réparer ou d'éliminer les molécules endommagées par l'attaque radicalaire (Penna et al., 2009).

6.3. Les systèmes de défense antioxydants

Les systèmes antioxydants présents dans l'organisme sont, soit d'origine endogène, soit exogène. On distingue également les antioxydants enzymatiques des antioxydants non enzymatiques (Niki, 2010). Les antioxydants peuvent donc être produits de façon endogène ou provenir de sources exogènes, comme l'alimentation ou les suppléments antioxydants (Vertuani et al., 2004).

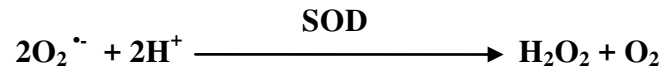
6.3.1. Les systèmes antioxydants enzymatiques

Les systèmes antioxydants enzymatiques sont d'origine endogène. Ces différentes enzymes sont en interrelation dans la régulation du stress oxydant intracellulaire (Matés et al., 1999). Les enzymes antioxydantes sont les premières lignes de défenses contre les entités oxydantes. Leur rôle est de diminuer la quantité de ROS présentes dans la cellule. Parfois ces enzymes nécessitent des oligo-éléments (Cu, Zn, Mn, Se, Fe) comme cofacteurs pour pouvoir exercer leur activité enzymatique.

Les principales enzymes antioxydantes sont la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT) et la glutathion peroxydase (GPx) (Garrel et al., 2007). Ces enzymes ont une action complémentaire (fig.6) sur la cascade radicalaire au niveau de l' $O_2^{\cdot-}$ et du H_2O_2 , conduisant finalement à la formation de l'eau et de l'oxygène moléculaire (Lehucher-Michel et al., 2001).

- ***La Superoxyde dismutase (SOD)***

La SOD est une enzyme essentielle de défense contre les ERO. Elle est capable de transformer par dismutation de l'anion superoxyde, première espèce toxique en une molécule d'oxygène et de peroxyde d'hydrogène qui est beaucoup moins réactif (Zelko et al., 2002).

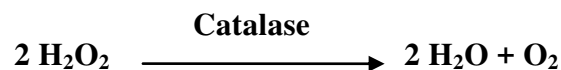


Le mécanisme réactionnel est catalysé par un métal situé au centre de l'enzyme dont la nature permettra de distinguer les superoxydes dismutases à manganèse (MnSOD) protégeant la mitochondrie, des superoxydes dismutases à cuivre-zinc protégeant le cytosol (cCu-Zn SOD), la face externe de la membrane des cellules endothéliales (ecCu- Zn SOD) ou le plasma sanguin (pCu-Zn SOD) (Favier, 2003).

Cependant, le peroxyde d'hydrogène généré par les SODs est notamment impliqué dans la réaction de Fenton qui produit un radical très réactif, le radical hydroxyle (OH^{\cdot}). Ainsi, le peroxyde d'hydrogène est détoxifié par une seconde ligne de défenses composée d'autres enzymes telles que la catalase et la glutathion peroxydase (GPx) (Ganther, 1999).

- *La Catalase (CAT)*

La catalase ou CAT est une enzyme tétramérique contenant un groupe hème qui catalyse, d'où son nom, la décomposition du peroxyde d'hydrogène en eau et en dioxygène, selon la réaction suivante :



La catalase est présente dans de nombreux tissus mais son activité est particulièrement abondante dans les globules rouges, le foie et les reins. Par ailleurs, la catalase joue un rôle important dans la détoxification de H_2O_2 dans les peroxysomes (Schrader et Fahimi, 2006).

À haute concentration, le H_2O_2 intracellulaires entraîne une activation préférentielle de la catalase tandis que de très faibles concentrations seraient préférentiellement prises en charge par la GPx (Pamplona et Costantini, 2011).

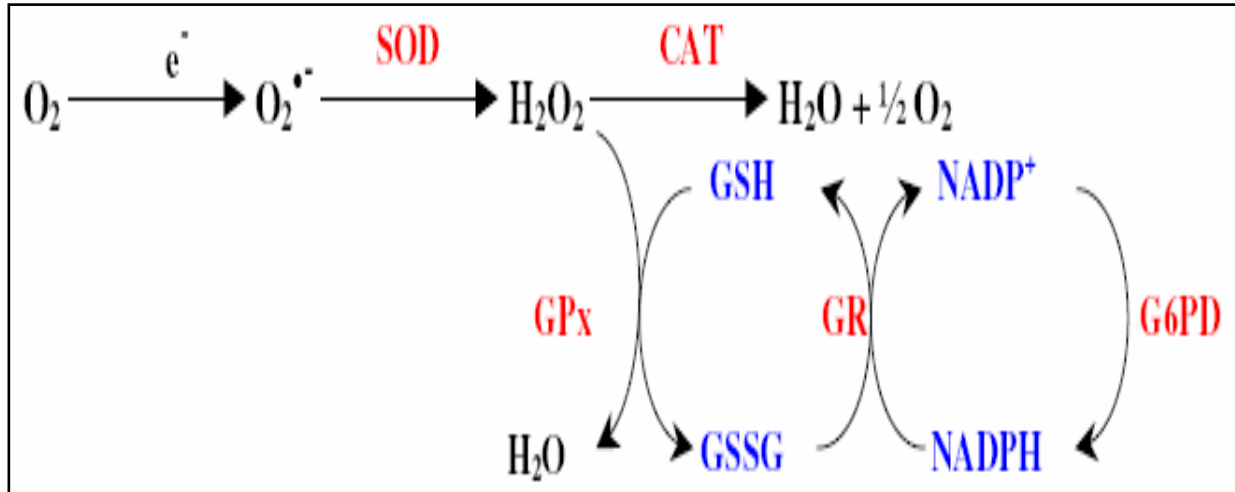


Figure 6 : Représentation schématique des mécanismes de défenses enzymatiques antioxydantes (Mate et al., 1999).

- **La Glutathion peroxydase (GPx) et reductase (GR)**

La glutathion peroxydase ou GPx est une enzyme tétramérique permettant également la décomposition du H_2O_2 . Elle agit plus lentement que la catalase mais elle a une meilleure affinité pour le H_2O_2 que cette dernière. La GPx est donc essentielle à la décomposition du H_2O_2 produit de manière continue et à des niveaux physiologiques dans la cellule.

Les GPx sont des enzymes sélénium-dépendantes ou sélénium-indépendantes et sont soit cytosoliques, comme c'est le cas de la première GPx identifiée (Mills, 1957), soit extracellulaires. Les GPx permettent la décomposition de H_2O_2 par l'oxydation de son co-substrat le glutathion réduit (GSH) en glutathion oxydé (GSSG) qui sera réduit par la suite par l'action de la glutathion réductase.

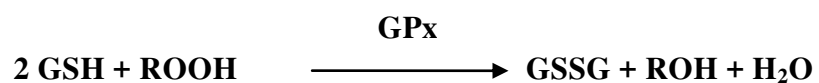


La glutathion réductase ou GR n'est pas une enzyme antioxydante à proprement parler dans le sens où elle n'a pas d'action directe sur les ROS. En revanche, elle a un rôle très important dans la réduction du glutathion, puissant antioxydant et co-substrat de la GPx.

En effet, le fonctionnement de la GPx nécessite un flux de glutathion recyclé par la coopération de plusieurs enzymes dont la glutathion réductase (GR) qui réduit le glutathion

oxydé en consommant du NADPH, lui-même régénéré grâce à la glucose 6 phosphate deshydrogénase (G6PDH) alimentée par le shunt des pentoses phosphates (fig.6) (Mate et al., 1999).

Les GPx permettent aussi la détoxification des cellules de certains hydroperoxydes (ROOH) qui sont les ROOH des esters de cholestérol, des phospholipides des membranes cellulaires, des lipoprotéines et de l'ADN (Delattre et al., 2005 ; Schrader et Fahimi, 2006 ; Valko et al., 2007). Ces hydroperoxydes vont alors se transformer en alcools (ROH) selon la réaction suivante (Halliwell et Gutteridge, 2008) :



6.3.2. Les systèmes antioxydants non enzymatiques

Les systèmes antioxydants non enzymatiques sont des nutriments naturellement apportés par l'alimentation (exogène) ou par des composés endogènes. Ils peuvent avoir un rôle de « scavenger », c'est à dire qu'ils ont la capacité de piéger les entités oxydantes en captant leur électron libre et en formant ainsi des entités plus stables qui pourront être éliminées par d'autres systèmes antioxydants.

6.3.2.1. Antioxydants non enzymatiques endogènes

Ce groupe d'antioxydants renferme de nombreuses molécules endogènes synthétisées par les cellules (glutathion, l'acide urique, la bilirubine) dont la plus importante est le glutathion réduit GSH (Tang et al., 2006 ; Menon et Goswami, 2007).

- ***Le Glutathion (GSH)***

Le glutathion est un tripeptide, formé par la condensation d'acide glutamique, de cystéine et de glycine : γ -L-Glutamyl cystéinyl glycine (fig.7). Il est principalement synthétisé par le foie et représente le premier système de défense antioxydant non enzymatique des cellules (Yu et al., 2003).

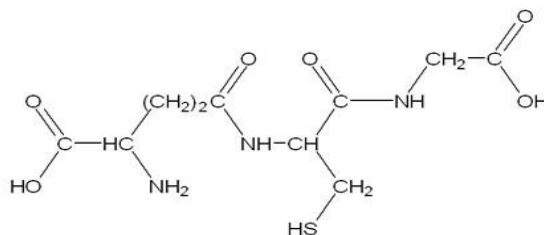


Figure 7 : Formule semi-développée du glutathion réduit (GSH)

(D'après Sies, 1999).

Au coeur des défenses antioxydantes, le glutathion est le thiol le plus abondant dans les organismes et les systèmes vivants (Sies, 1991). Le glutathion (GSH) et les thiols en général, sont d'excellents réducteurs, donneurs d'hydrogène et de puissants piègeurs de radicaux, réagissant directement avec le peroxyde d'hydrogène, le radical superoxyde, le radical hydroxyle (Pay Yu, 1994) et le monoxyde d'azote (Folkes et Wardman, 2004). Comme nous l'avons déjà signalé, le glutathion est également indispensable à l'activité enzymatique de la GPx.

Au cours de son action antioxydante, le glutathion réduit GSH est oxydé en glutathion disulfide GSSG par la glutathion peroxydase (GPx). Le rapport entre glutathion réduit et glutathion oxydé (GSH/GSSG) dépend de la concentration en espèces oxydantes, il diminue dans les états de stress oxydatif et peut dès lors servir de marqueur du stress oxydatif (Vamecq et al., 2004).

Le GSH est présent en grande quantité dans les organes exposés aux toxines tels que les reins, le foie, les poumons ou les intestins. Au contraire, il est peu présent dans les fluides biologiques (Gate et al., 1999).

- ***L'Acide urique***

Issu du catabolisme des purines, l'acide urique joue un rôle important dans le système antioxydant. Il apparaît comme étant l'antioxydant plasmatique le plus réactif avec les ROS, contribuant à lui seul à 60 % de la capacité antioxydante du plasma grâce à sa concentration élevée (Zhao et al., 2009).

L'acide urique est un puissant réducteur des radicaux libres : il réduit les radicaux peroxydes, hydroxyles et neutralise aussi l'anion superoxyde (Ames et al., 1981 ; Simic et Jovanovic, 1989).

En outre, des scientifiques japonais ont mis en exergue la capacité de l'acide urique à stopper les réactions d'oxydation en chaîne des lipides, en réagissant avec les radicaux lipidiques formés (Patterson et al., 2003).

- ***La Bilirubine***

La bilirubine est le produit final de la dégradation de l'hème de plusieurs protéines hémiques d'intérêt biologique comme l'hémoglobine des hématies et la myoglobine des muscles (Halliwell et Gutteridge, 2008 ; Paredi et al., 2002). Il s'agit d'un composé non hydrosoluble à pH physiologique qui se lie à l'albumine empêchant ainsi sa pénétration dans les tissus riches en lipides comme le cerveau.

Concernant sa fonction antioxydante, la bilirubine est un piègeur d'oxygène singulet et de radicaux peroxydes RO_2^{\bullet} et protège ainsi l'albumine et les acides gras qui y sont associés des attaques radicalaires (Théron et Bonnefont-Rousselot, 2005). Elle trouve donc toute son expression dans la protection des membranes cellulaires contre la peroxydation lipidique (notamment des cellules sanguines) et des protéines plasmatiques ; certains auteurs pensent que la bilirubine serait un antioxydant efficace de l'oxydation protéique médiée par le peroxydant et pourrait être plus efficace encore que la vitamine E dans la prévention de la peroxydation lipidique (Paredi et al., 2002). La bilirubine est reconvertie en biliverdine par certains ERO, qui est à nouveau réduite par la biliverdine réductase (Halliwell et Gutteridge, 2008).

6.3.2.2. Antioxydants non enzymatiques exogènes

En outre, le système oxydant du corps humain comprend des molécules exogènes, c'est-à-dire apportées par l'alimentation, telle que la vitamine E, le b-carotène (provitamine A), la vitamine C (acide ascorbique), les polyphénols et autres phytonutriments. Les polyphénols seront particulièrement développés par la suite.

- ***La Vitamine E***

La vitamine E (fig.8) est le nom commun utilisé pour toutes les molécules possédant des activités biologiques identiques à celles de la famille des tocophérols. Sa forme naturelle inclut quatre tocophérols isomères (α , B, γ et δ) avec une activité antioxydante variable (Carr et al., 2000).

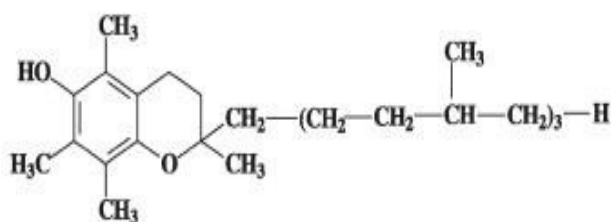


Figure 8 : Structure chimique de l'alpha-tocophérol ou vitamine E
(D'après Flora et al., 2008).

La forme la plus active, l' α -tocophérol, est le principal antioxydant liposoluble dans le plasma et les érythrocytes. Situé dans les lipoprotéines et les membranes, il est capable de piéger l'oxygène singulet et de réagir avec le radical hydroxyle et former le radical tocophéryle (Brigelius-Flohe et al., 1999). L' α -tocophérol est régénéré grâce à la vitamine C et la tocophéryl réductase glutathion dépendante qui sont capables de réduire le radical tocophéryle en α -tocophérol (Kamal-Eldin et Appelqvist, 1996).

Les produits d'origine végétale constituent la source majeure de vitamine E, les éléments les plus riches étant les céréales et les huiles végétales (Cuvelier et al., 2003).

- **La Vitamine A (famille des caroténoïdes)**

Les caroténoïdes sont notamment connus pour être des pigments rouges et oranges de nombreux fruits et légumes. Parmi les 600 caroténoïdes identifiés, 50 d'entre eux sont reconnus pour être des précurseurs de la vitamine A, le plus connu étant le B-carotène (fig.9).

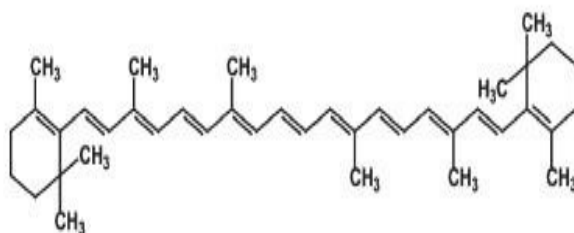


Figure 9 : Structure du β -carotène (D'après Flora et al., 2008).

Les caroténoïdes piègent les molécules d'oxygène singulet (Stahl et Sies, 2002), formées par les radiations solaires. Grâce à leur longue chaîne carbonée, riche en doubles liaisons, ils

sont également de bons piègeurs de radicaux peroxydes issus de l'oxydation des lipides (Stahl et Sies, 1997), empêchant ainsi les dommages causés par l'oxydation des membranes cellulaires (Mirkhalaf et al., 2011).

- **La Vitamine C**

La vitamine C ou acide L-ascorbique est un antioxydant hydrosoluble souvent considéré comme le principal antioxydant des fluides extracellulaires. C'est un piègeur très efficace de l'ensemble des EROs. Il réagit particulièrement avec les peroxydes aqueux en formant le radical ascorbyle ce qui protège les lipoprotéines et les membranes de la peroxydation lipidique (Roussel et al., 2005).

En outre, elle permet de régénérer la forme non radicalaire de la vitamine E. Lorsqu'elle est à son tour oxydée, elle est réduite par l'acide alpha lipoïque ou par les ascorbate réductases ou excrétée dans les urines. Sa structure est présentée ci-dessous (fig.10)

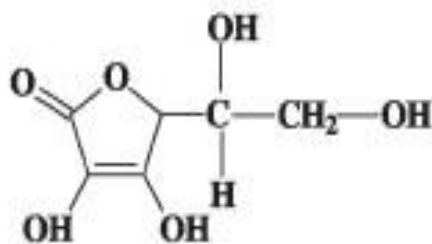


Figure 10 : Structure de l'acide L-ascorbique (D'après Flora et al., 2008).

Ils existent également toute une série de composés naturellement apportés par l'alimentation, comme par exemple les polyphénols et les différents thiols (Vamecq et al., 2004). Les polyphénols sont retrouvés sous forme de dérivés glucosidiques dans de nombreux fruits et légumes ; ils se répartissent en flavonoïdes, acides phénoliques, lignanes et stilbènes qui ont un pouvoir antioxydant important (Urquiaga et Leighton, 2000).

7. Les maladies liées au stress oxydant

Le stress oxydant est impliqué dans de très nombreuses maladies comme facteur déclenchant ou associé à des complications de l'évolution (Favier, 2003). La multiplicité des conséquences médicales de ce stress oxydant vient du fait que de nombreux organes ou tissus

peuvent devenir la cible d'un stress oxydant (Bonnefont-Rousselot et al., 2001 ; sohal et al., 2002 ; Delattre et al., 2005).

De nombreuses pathologies (fig.11), à savoir les maladies neurologiques, les cancers, les processus inflammatoires ou encore le vieillissement accéléré, sont associées au stress oxydant. Ce dernier est aussi un des facteurs potentialisant l'apparition de maladies plurifactorielles tels le diabète, la maladie d'Alzheimer, les rhumatismes et les maladies cardiovasculaire (Zhang et Jope, 1999 ; Favier, 2003).

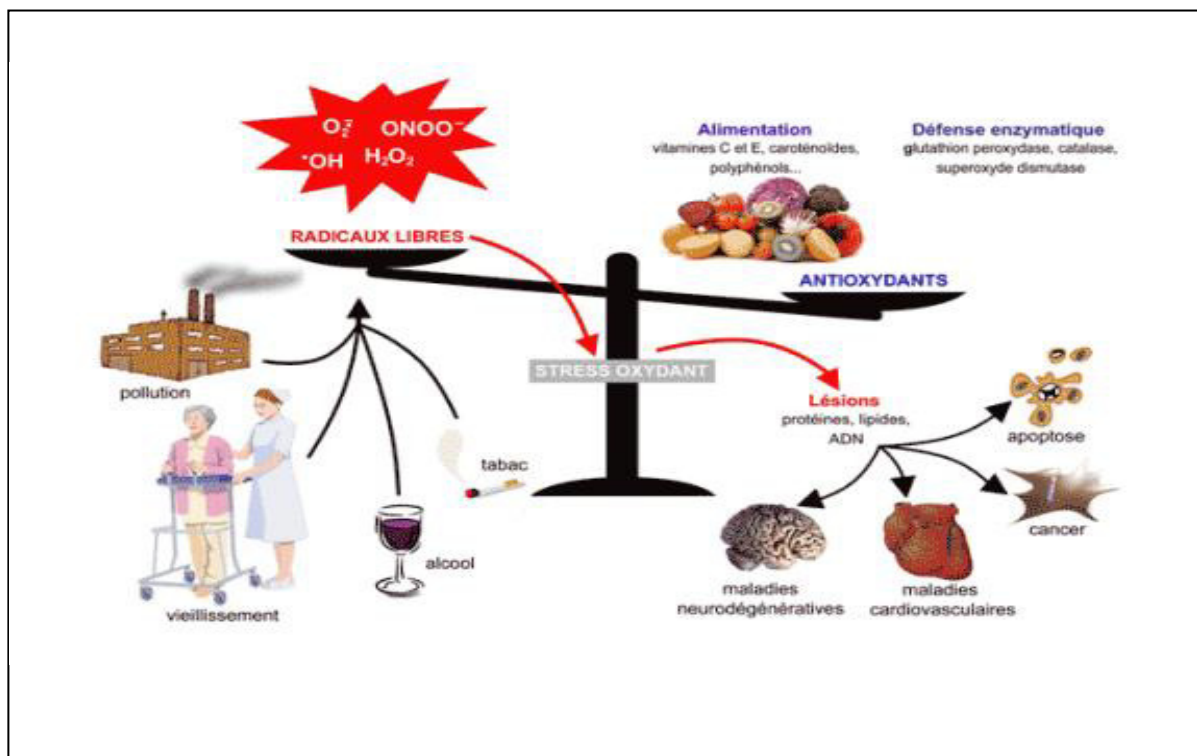


Figure 11 : Différents pathologies associées au stress oxydant (Morandat et al., 2013)

La plupart des maladies induites par le stress oxydant apparaissent avec l'âge car le vieillissement diminue les défenses antioxydantes et augmente la production mitochondriale de radicaux. L'augmentation de l'apport nutritionnel en antioxydant visera donc essentiellement à prévenir ces maladies, de même, une consommation régulière en antioxydant pourrait avoir un effet bénéfique, mais essentiellement préventif (Favier, 2003).

CHAPITRE II. POLYPHÉNOLS EN TANT QU'ANTIOXYDANTS

II. Polyphénols en tant qu'antioxydants

Comme nous l'avons décrit, le stress oxydant peut être induit par un dysfonctionnement des défenses antioxydantes et/ou une surproduction d'EROs. L'apport d'antioxydants dans notre alimentation est susceptible d'améliorer le niveau des défenses antioxydantes et par conséquent de prévenir l'apparition des pathologies associées au stress oxydant. A ce titre, l'utilisation d'antioxydants comme les polyphénols a été particulièrement étudiée.

1. Présentation générale sur les polyphénols

1.1. Diversité structurale, sources alimentaires et classification des polyphénols

Les polyphénols, dénommés aussi composés phénoliques, sont des molécules spécifiques du règne végétal et qui appartiennent à leur métabolisme secondaire (Mompon et al., 1996 ; He et al., 2008). On les trouve dans les plantes, depuis les racines jusqu'aux fruits. Leurs fonctions ne sont pas strictement indispensables à la vie du végétal, cependant ces substances jouent un rôle majeur dans les interactions de la plante avec son environnement (Richter, 1993).

Le terme « phénol » englobe approximativement 10000 composés naturels identifiés (Martin et Andriantsitohaina, 2002 ; Druzyńska et al., 2007). L'élément structural fondamental qui les caractérise est la présence d'au moins un noyau phénolique à 6 carbones (fig.12), auquel est directement lié au moins un groupe hydroxyle (OH) libre ou engagé dans une autre fonction : éther, ester ou hétéroside. (Bruneton, 1999 ; Balasundram et al., 2006).

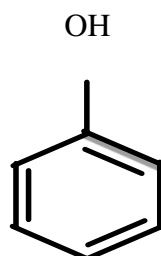


Figure 12 : Structure du noyau phénol (Sarni-Manchado et Cheynier, 2006)

Les polyphénols sont répartis de façon ubiquitaire dans les fruits et légumes qui en constituent les principales sources alimentaires, avec de fortes variations selon les espèces (Scalbert et Williamson, 2000). A ces aliments s'ajoutent d'autres végétaux, les plantes aromatiques ou les huiles ainsi que les boissons comme le thé, le café et le vin (Socynska-Kordala et al., 2001). Les épices telles le gingembre, le curcuma, le poivre noir, la muscade et

la vanille constituent également une source importante de polyphénols (Balasundram et al., 2006).

Il est possible de classer les polyphénols selon le nombre de cycles phénoliques qu'ils contiennent et selon les éléments structuraux qui lient différents cycles entre eux. Ainsi, on distingue quatre grands groupes de polyphénols : les flavonoïdes, les acides phénoliques, les stilbènes et les lignanes (Manach et al., 2004^a) (tab.2).

- **Les Flavonoïdes**

Les flavonoïdes constituent le plus grand groupe de composés phénoliques, avec plus de 6000 composés naturels qui sont quasiment universels chez les plantes vasculaires. Ils constituent des pigments responsables des colorations jaune, orange et rouge de différents organes végétaux (Knežević et al., 2012). Ces composés possèdent tous un squelette de base de quinze atomes de carbone constitué de deux unités aromatiques; deux cycles en C6 (A et B), reliés par un hétérocycle en C3 (fig.13) (Pietta, 2000).

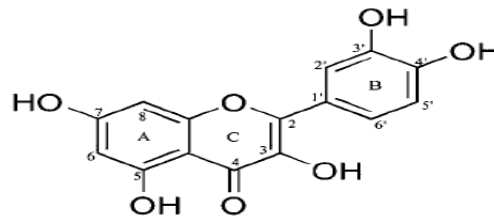
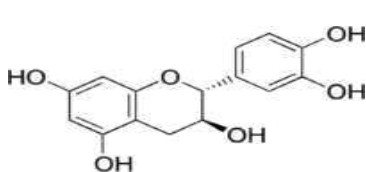
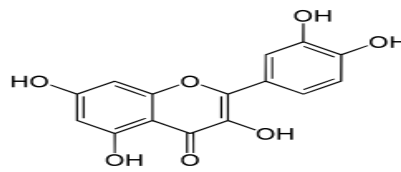


Figure 13 : Structure générale du noyau des flavonoïdes (D'après Heim et al., 2002)

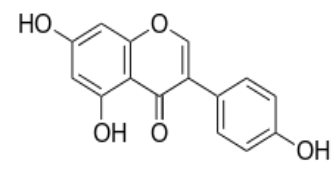
Structuralement les flavonoïdes se répartissent en plusieurs classes de molécules selon le degré d'oxydation et la nature des substituants portés sur le cycle C (Pietta, 2000), 14 groupes différents ont été identifiés dont six groupes (tab. 2) sont particulièrement les plus répandus et les mieux caractérisés ; flavones, isoflavones, flavanones, flavanols, flavonols, anthocyanidines (Heim et al., 2002 ; Hendrich, 2006). La figure 14 représente 3 exemples de flavonoïdes spécifiques.



Catéchine (flavanol)



Quercétine (flavonol)



Génistéine (Isoflavone)

Figure 14 : Quelques flavonoïdes (Tanwar et Modgil, 2012)

Tableau 2 : Les grandes familles de polyphénols (Defraigne et Pincemail, 2008).

Famille	Principaux composés	Origine
Acide hydroxy- benzoïques	Acide vanillique	Vanille
	Acide gallique	Feuilles de thé
Acides hydro- cinnamiques	Acide caféique	Café
	Acide férulique	Riz, blé, asperges
	Acide chlorogénique	Pelure de pomme de terre, pomme, artichaut
Stilbène	Resvératrol	Raisin, vin
Flavanoïdes		
- Flavonols	Quercétine, kaempférol	Oignon, brocoli
- Flavones	Luéoline, apigénine	Céleri
- Flavanones	Naringénine	Agrumes
- Flavones-3-ols	Catéchine, épicatechine	Raisin, thé vert, chocolat,
- Isoflavones	Génistéine, daidzéine	Soja
- Anthocyanidines	Cyanidine	Fruits rouges, raisin
Lignines	Lignane	Bois

- **Les Acides phénoliques**

Le terme acide- phynol peut s'appliquer à tous les composés organiques possédant au moins une fonction carboxylique et hydroxyl phénolique (Bruneton, 1999). Les acides phénoliques sont divisés en deux catégories (fig.15) (Kochetova et al., 2007):

- ✓ les dérivés de l'acide benzoïque comme l'acide gallique ou vanillique et ;

- ✓ les dérivés de l'acide cinnamique comme l'acide caféique, coumarique, sinapique et férulique.

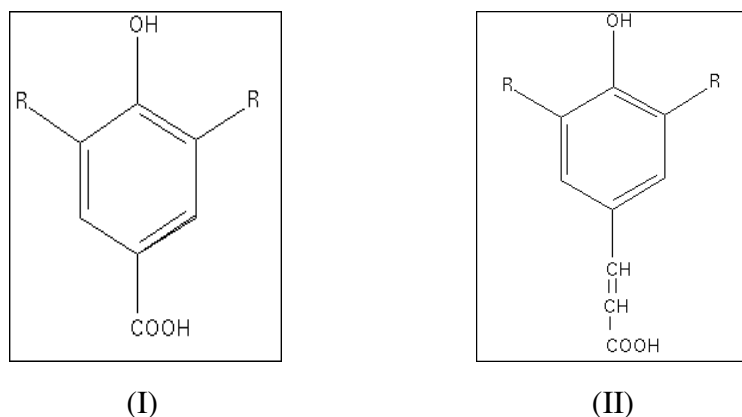


Figure 15 : Acides phénoliques, squelette benzoïque (I) et squelette cinnamique (II).

Les acides phénoliques participent directement aux réactions de stress environnementaux, comme les attaques par les ravageurs et contribuent au processus de guérison de la plante par la lignification des tissus endommagés (Manach et al., 2004^a).

- **Les Stilbènes**

Les stilbènes sont des composés phénoliques contenant au minimum deux noyaux aromatiques reliés par un double liaison, formant un système conjugué (fig.16). Ces composés sont en très petite quantité dans notre alimentation, le plus connu d'entre eux est le resvératrol (Kundu et Surh, 2008).

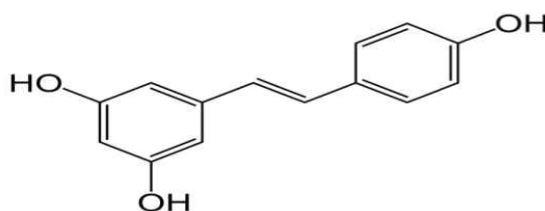


Figure 16 : Structure d'un stilbène, le resvératrol (D'après Harmatha et al., 2011).

Les stilbènes sont des phytoalexines, composés produits par les plantes en réponse à l'attaque par les microbes pathogènes fongiques, bactériens et viraux (Irchhaiya et al., 2014). Les sources principales des stilbènes sont les raisins, les vins, le soja et les arachides (Ozcan et al., 2014).

- *Les lignanes*

Les lignanes constituent une classe importante de métabolites secondaire dans le règne végétal. Ce sont des composés dont le squelette résulte de l'établissement d'une liaison entre les carbones β des chaînes latérales de deux unités dérivées du phénylpropane (fig.17). Bien qu'ils entrent dans la composition de certaines graines, céréales, fruits et autres légumes, ils sont environ 1000 fois plus concentrés dans les graines de lins (El Gharras, 2009).

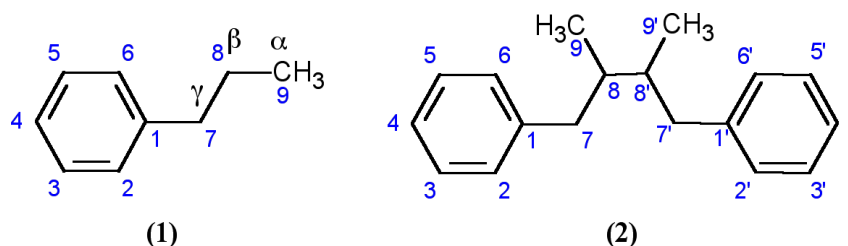


Figure 17 : Structure et numérotation des atomes de carbone du phénylpropane (1) et des lignanes (2) (liaison β - β' ou 8,8') (Sainvitu et al., 2011).

Les lignanes sont retrouvés dans presque toutes les parties de la plante à différentes concentrations où ils jouent un rôle déterminant dans le système de défense contre les herbivores et les pathogènes (Gang et al., 1999).

1.2. Pharmacocinétique et biodisponibilité des polyphénols

La biodisponibilité peut être définie comme la fraction réelle d'un composé ou d'un nutriment ingéré qui atteint la circulation systémique et les sites spécifiques où elle peut exercer son action biologique. Les propriétés biologiques attribuées aux polyphénols dépendent en grande partie de leur biodisponibilité, qui diffère beaucoup d'un composé à l'autre. En effet, le taux d'absorption des polyphénols consommés varie beaucoup en fonction de la structure et des propriétés chimiques propres à chaque classe de composés (Bravo, 1998 ; Scalbert et Williamson, 2000). Les connaissances sur le métabolisme et la biodisponibilité des polyphénols sont donc primordiales à l'évaluation et à la compréhension de leurs effets biologiques. Les connaissances actuelles permettent la mise en place d'un schéma global de l'absorption ainsi que du métabolisme de ces micronutriments (fig.18).

1.2.1 Absorption

Le principal lieu d'absorption des polyphénols est l'intestin grêle, mais ceux-ci peuvent également être absorbés au niveau de l'estomac et du côlon (Hollman et al., 2011). La majorité

des polyphénols de l'alimentation ne peuvent pas être absorbés sans d'abord être hydrolysés par les enzymes intestinales ou par les bactéries du microbiote intestinal. C'est le cas des composés ingérés sous forme de glucosides, c'est-à-dire qui sont liés à un sucre (principalement le glucose), d'esters ou de polymères. L'hydrolyse est nécessaire afin de réduire le poids moléculaire de ces composés et de les rendre davantage lipophiles, ce qui facilite leur absorption (Gee et al., 2000; Prior et Wu, 2006). Cependant, seuls les anthocyanes et quelques acides hydroxycinnamiques sous forme liée tels que l'acide chlorogénique peuvent être absorbés directement à partir de l'estomac (Manach et al., 2005).

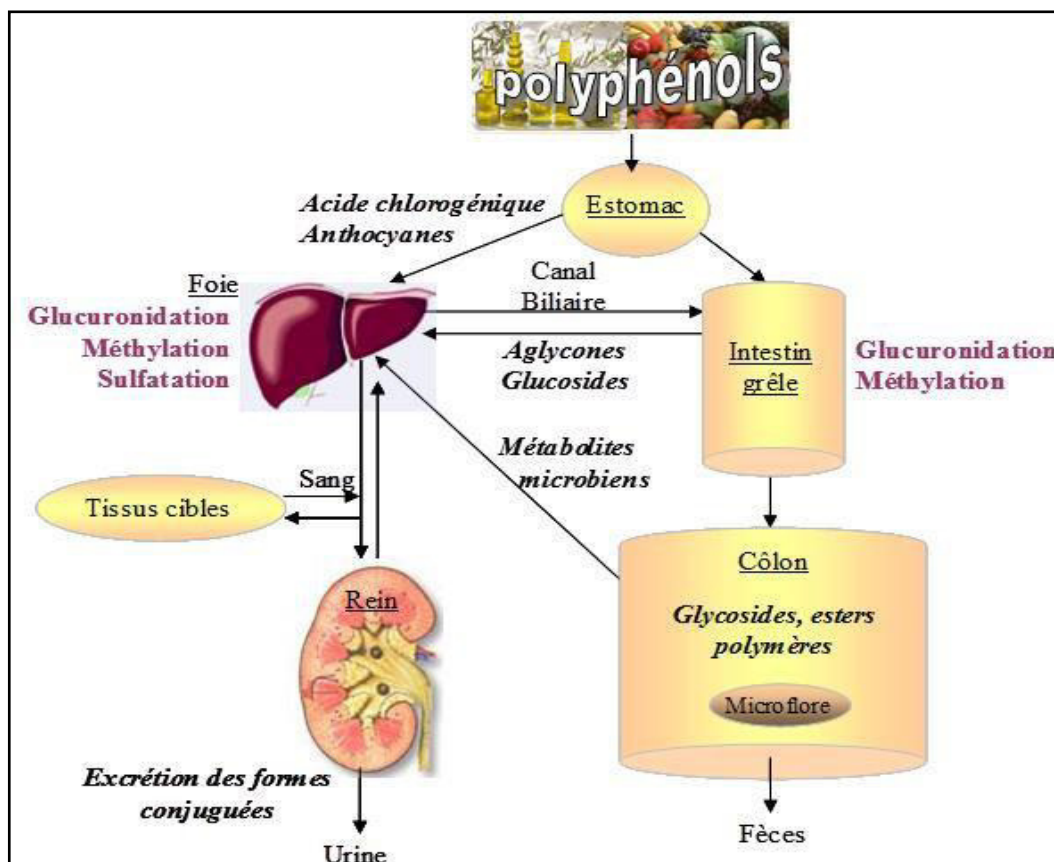


Figure 18 : Schéma général de biodisponibilité des polyphénols (Manach et al., 2006).

1.2.2. Conjugaison

Suite à leur absorption, les polyphénols vont subir trois types de conjugaison : méthylation, glucuronidation et sulfatation au niveau de l'intestin grêle puis du foie. Ces étapes de conjugaison sont catalysées par des enzymes de phase II (Tilgmann et Ulmanen, 1996; Piskula et Terao, 1998). Les processus de conjugaisons sont à la fois producteurs de potentiels

métabolites actifs mais sont responsables, par ailleurs, d'une réduction du taux de polyphénols total dans la circulation sanguine en augmentant leurs excrétions. La concentration plasmatique maximale de polyphénols et de leurs formes conjuguées (après une consommation moyenne de 50 mg en équivalent d'aglycone) dépasse rarement 1 μM et peut être beaucoup plus faible (< 50 nM pour les anthocyanes) (Manach et al., 2005).

1.2.3. Transport plasmatique

Dans le plasma, les métabolites des polyphénols sont liés aux protéines plasmatiques et en particulier à l'albumine, avec cependant des variations d'affinité selon les molécules (Boulton et al., 1998). La liaison à l'albumine peut avoir des conséquences importantes sur la vitesse d'élimination des métabolites et sur leur libération au niveau des tissus cibles. On admet classiquement que la captation cellulaire est proportionnelle à la concentration de métabolites libres, cependant, l'impact de la liaison à l'albumine sur l'activité biologique des polyphénols n'est pas aussi clairement établi (Dangles et al., 1999).

1.2.4. Distribution dans les tissus et organes

Les polyphénols ingérés peuvent pénétrer dans les tissus et organes, en particulier au niveau des lieux de métabolisation comme l'intestin et le foie. Des études menées avec des polyphénols marqués (quercétine, resvératrol) ont montré que 1 à 6 heures après l'ingestion, la radioactivité était principalement détectée dans le sang et les organes du système digestif (Mullen et al., 2002 ; Vitrac et al., 2003). Toutefois, les polyphénols ont également été détectés dans des organes tels que le cerveau, le coeur, les reins, le thymus, le pancréas et la prostate. Les concentrations en polyphénols dans ces tissus étaient de 30 à 3000 ng d'équivalents aglycones/g de tissu selon le polyphénol considéré, la dose administrée et le tissu analysé (Manach et al., 2004^a; Felgines et al., 2009).

1.2.5. Excrétion

Les polyphénols sont principalement excrétés par les voies biliaire et urinaire. L'implication de chacune de ces voies dépend principalement de la structure des molécules. Ainsi, les métabolites hautement conjugués seront principalement éliminés dans la bile tandis que les petits conjugués comme les monosulfates seront préférentiellement éliminés par voie urinaire (Crespy et al., 2003). La quantité totale de métabolites éliminés dans les urines est hautement corrélée à la concentration plasmatique maximale (D'Archivio et al., 2007).

1.3. Propriétés biologiques des polyphénols

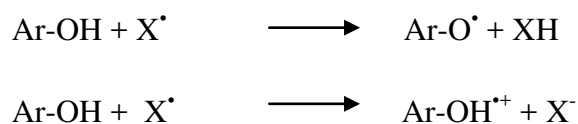
Les activités biologiques relatives à ce type de composés sont relativement diversifiées. Chaque classe chimique de polyphénols semble être utilisée pour ses vertus spécifiques (Martin et Andriantsitohaina, 2002). Les composés phénoliques sont principalement reconnus pour leur activité antimicrobienne (Karakaya, 2004). Certains d'entre eux, tel que les flavonoïdes, possèdent des propriétés anti-inflammatoires (Middleton et al., 2000). D'autres, tel que les lignanes, possèdent des propriétés cytostatiques (Habtemariam, 2003). Certains possèdent également des propriétés anti-allergiques, hépatoprotecteurs, hypocholestérolémiant, diurétiques, antibactériens, antiviraux et parfois antispasmodiques (Bruneton, 1993). Toutefois, l'activité antioxydante, au sens large, est considérée comme responsable des propriétés « préventives » des polyphénols (Gordon, 1996; Rohdewald, 2002).

1.3.1. Activité antioxydante des polyphénols

Les propriétés antioxydantes sont attribuées en partie, à la capacité de ces composés naturels à piéger directement les radicaux libres, d'inhiber les ions métalliques et les enzymes impliqués dans la production des EOR et de protéger les systèmes de défense antioxydants (Halliwell, 1994).

1.3.1.1. Piégeage direct de radicaux libres

La réduction de divers radicaux par les polyphénols a été beaucoup étudiée afin de déterminer les éléments majeurs de l'activité antioxydante. A cause de leur faible potentiel redox, les polyphénols (Ar-OH) sont capables de réduire rapidement les radicaux libres oxydants comme le superoxyde, les peroxydes (ROO[•]), les alkoxydes (RO[•]) et l'hydroxyle par transfert d'hydrogène ou d'électron :



Où

X[•] : Représente l'une des ERO mentionnées ci-dessus ;

Le radical aryloxyde (Ar-O[•]) peut réagir avec un autre radical pour former une structure o-quinone plus stable (Jovanovic et al., 1994).

Dans le mécanisme de transfert d'électron, l'antioxydant phénolique (ArOH) réagit avec le radical libre (X^{\bullet}) et devient un cation radical stable $ArOH^{\bullet+}$ (Dugas et al., 2000 ; Pietta, 2000).

La capacité antiradicalaire des polyphénols dépend généralement de leurs structures à laquelle s'ajoutent les groupements hydroxyles ce qui induit la présence d'atomes d'hydrogène labiles (Tsao, 2010). Les positions et degrés d'hydroxylation jouent une part importante, dans l'activité antioxydante des polyphénols. Les polyphénols porteurs d'un groupement catéchol (un noyau aromatique porteur de deux fonctions hydroxyles adjacentes) ont un potentiel antioxydant élevé (Dziedzic et Hudson, 1983).

1.3.1.2. Chélation des ions métalliques

Les polyphénols contribuent à l'inhibition de la formation des radicaux libres par la chélation de métaux de transition tels que le fer (Fe^{2+}) et le cuivre (Cu^+), qui sont essentiels pour de nombreuses fonctions physiologiques. Ils entrent notamment dans la composition des hémoprotéines et sont de cofacteurs d'enzymes du système de défense antioxydant (Fe^{2+} pour la catalase et Cu^+ pour la superoxyde dismutase). Cependant, ils peuvent aussi être responsables de la production des radicaux hydroxyles très réactifs (Pietta, 2000 ; Heim et al., 2002). Les polyphénols abondants dans l'alimentation, notamment les flavonoïdes, séquestrent ces ions métalliques au niveau de différents sites (fig.19).

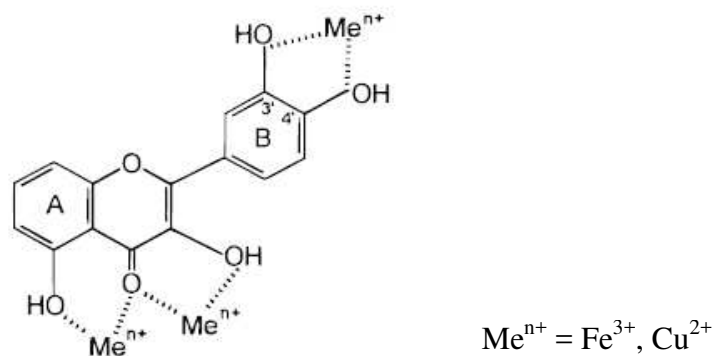


Figure 19 : Flavonoïdes et leurs sites proposés pour la chélation des ions métalliques (D'après Pietta, 2000).

1.3.1.3. Inhibition enzymatique

Les polyphénols possèdent une affinité pour une grande variété de protéines (Havsteen, 2002 ; Dangles et Dufour, 2008), via des interactions de van der Waals (cycles aromatiques) et

des liaisons hydrogènes (groupements OH phénoliques). Par exemple, les aglycones des flavonoïdes, essentiellement les flavones et les flavonols (noyaux tricycliques plans et polarisables), ont une capacité de se lier avec beaucoup de protéines globulaires, notamment des enzymes, des récepteurs et transporteurs (Dangles, 2012).

L'inhibition des enzymes génératrices des radicaux libres dans les systèmes biologiques est un mécanisme important d'effet antioxydant pour les polyphénols. Plusieurs travaux ont rapporté que les flavonoïdes sont les molécules les plus susceptibles d'être impliquées dans cet effet (Lin et al., 2002), par formation de complexe inhibiteur-enzyme et/ou par piégeage direct des ERO (Dangles et Dufour, 2008).

1.3.2. Les polyphénols: une action pro-oxydante ?

Tandis que les propriétés antioxydantes des polyphénols corroborent l'hypothèse d'un rôle positif dans la nutrition humaine et la prévention de maladies, certains auteurs invoquent l'activité prooxydante de ces composés in vitro (Fukumoto et Mazza, 2000). En fait, si la capture des espèces réactives de l'oxygène (ERO) est effectivement un mécanisme d'action antioxydante, la réaction éventuelle des phénols avec le dioxygène est une cause potentielle de toxicité par production des EOR (Dangles, 2006). Cependant, seuls les polyphénols les plus réducteurs peuvent manifester cet effet en entrant dans des cycles redox qui génèrent des ERO. Par leurs effets pro-oxydants, certains polyphénols peuvent endommager l'ADN, les lipides et d'autres biomolécules (Yen et al., 2002).

2. La quercétine et la vanilline – deux molécules modèles

Les deux antioxydants utilisés lors de cette étude étaient la quercétine et la vanilline. Ces deux éléments actifs sont naturellement présents dans notre alimentation, ils font partie de la famille des polyphénols.

La quercétine est l'une des molécules les plus représentatives de la famille des flavonoïdes. Elle intervient dans la quasi-totalité des mécanismes cités précédemment et se trouve être l'objet de la plupart des études. Largement utilisée pour ses propriétés aromatisantes, la vanilline fait également l'objet de plusieurs études et a montré une bonne activité cytotprotectrice et antioxydante.

Dans cette partie, nous allons présenter quelques généralités et les propriétés biologiques de ces deux molécules antioxydantes.

2.1. Quercétine

2.1.1. Description et propriétés physico-chimiques

La quercétine (3, 3', 4', 5, 7- pentahydroxyflavone) est un flavonoïde polyphénolique appartenant à la classe des flavonols (Mlcek et al., 2016). La structure chimique de la quercétine comporte un noyau commun flavone composé de deux cycles benzéniques A et B reliés entre eux par un pyrane hétérocycle C (Christelle et al., 2011). La Figure 20 présente la nomenclature des cycles et la numérotation des hydroxyles de ce flavonoïde aglycone utilisées dans le cadre de ce travail.

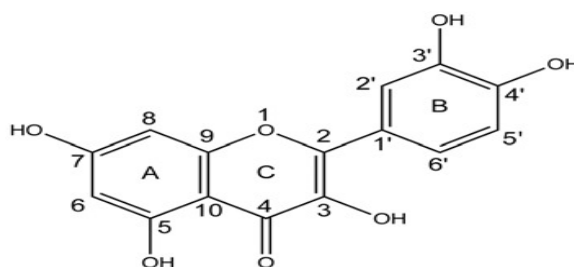


Figure 20 : Nomenclature des cycles et numérotation systématique des hydroxyles de la quercétine (Christelle et al., 2011).

La quercétine est un des flavonoïdes naturels parmi les plus actifs biologiquement (Leighton et al., 1992). Elle est consommée quotidiennement par l'être humain vu sa distribution étendue dans l'alimentation. Ce flavonol se trouve principalement sous forme glycosylée dans une grande variété de fruits, de légumes et de boissons. Dans les plantes, différents types de sucres incluant le glucose, le galactose, le rhamnose, le xylose ou le rutinose, sont liés aux groupements hydroxyles de la molécule aglycone par des liaisons glycosidiques. Les principales cibles de la glycosylation sont les groupements hydroxyles sur les positions 3, 7 et 4' (Harwood et al., 2007).

Le tableau 3 présente les quantités de quercétine retrouvées chez quelques fruits et légumes. Plusieurs études ont parfois été effectuées pour un même aliment ce qui correspond aux différentes valeurs reprises dans le tableau. Ces variations de teneur en quercétine dépendent de facteurs extrinsèques tels que des facteurs géographiques, climatiques mais également des ressources dont les plantes disposent, du degré de maturation de la plante, de la fraction du fruit étudié ou encore de la préparation des aliments susceptibles de modifier les concentrations analysées.

Tableau 3: Teneur en équivalent quercétine de quelques fruits et légumes.

Fruit ou légume	Quantité (mg/100g)
oignon	3.5 ^a
pomme	3.6- 14 ^b
tomate	1.1 ^b
canneberge	13 ^b
olive	6-12.2 ^b
raisin	3.6 ^b

^a : Souci et al., 2008.

^b : Kyle et Duthie, 2006.

De couleur jaune vif, la quercétine a pour formule brute $C_{15}H_{10}O_7$ (Houngbèmè et al., 2015) et une masse molaire de 302 g.mol^{-1} (Alilou et al., 2014). La solubilité de la quercétine dans différents types de milieux est généralement faible. Dans les solvants organiques d'usage courant en bioprocédé, leurs solubilités sont significativement accrues par rapport à l'eau mais restent encore très limitées (Rothwell et al., 2005).

2.1.2. La biodisponibilité de la quercétine

Il existe beaucoup d'études visant à déterminer la biodisponibilité de la quercétine tant chez l'animal comme le rat (Manach et al., 1997; Crespy et al., 1999, 2001; Mullen et al., 2008) que chez l'humain (Young et al., 1999; Krogholm et al., 2010). Ce champ d'étude reste cependant en constante évolution.

La quercétine absorbée par voie orale subit, comme beaucoup de flavonoïdes, une métabolisation au niveau des cellules épithéliales de l'intestin ainsi que lors de son passage sanguin par le foie. Cette métabolisation implique une hydrolyse du glucide rattaché à l'aglycone qui est ensuite conjugué à un sulfate, un méthyl ou un glucuronide. Une partie de la quercétine conjuguée est ensuite sécrétée en retour dans la lumière intestinale, possiblement via le canal biliaire (Crespy et al., 1999; Manach et al., 2004^b; Matsukawa et al., 2009).

Chez l'humain, entre 20 à 50% de la quercétine ingérée sous forme glycosylée serait absorbée (Hollman et Arts, 2000). La quercétine retrouvée sous forme d'aglycone est en quantité très faible dans le sang. La quercétine est enfin éliminée à un faible taux dans les urines (Young et al., 1999). D'ailleurs, on a suggéré que la quercétine serait éliminée en grande partie sous une forme transformée d'acides phénoliques (Mullen et al., 2008).

La micro flore de l'intestin grêle distale et du colon aurait aussi une influence dans la biodisponibilité de la quercétine. Les bactéries du tractus digestif possèdent les enzymes nécessaires pour conjuguer les flavonoïdes, qui seront alors soit absorbés, soit éliminés via les fèces (Manach et al., 2004^b).

2.1.3. Effets physiologiques de la quercétine

Entre son absorption par l'organisme et son élimination, la quercétine est reconnue comme produisant des effets physiologiques précis. Le caractère hydrophobie de la quercétine lui permet d'être distribuée dans tous les tissus. De plus, aucune accumulation de quercétine n'a été démontrée dans l'organisme ce qui prouve ainsi son caractère non-toxique (Hollman et al., 1997).

Une des caractéristiques reconnues de la quercétine est celle d'agir comme antioxydant en limitant l'action délétère de radicaux libres auprès de structures cellulaires dont l'ADN ou les membranes phospholipidiques. Des études ont révélé que la quercétine est la plus puissante des flavonoïdes en terme de stabilisatrice de RL et de ROS tels que le NO, le ONOO⁻ et le O₂^{•-} (Boots et al., 2008). Il semblerait que ce potentiel antioxydant soit dû au groupement catéchol ainsi qu'aux nombreux groupements hydroxyyles de la quercétine (Heijnen et al., 2001). De plus, le groupe cathécol de la quercétine participerait à la chélation des métaux pour ainsi, contribuer aux propriétés antioxydantes de la quercétine (Zhao et al., 2004).

Les propriétés antioxydantes de ce flavonoïde sont à l'origine de plusieurs fonctions biologiques attribuées à la quercétine. En effet, la quercétine est décrite pour posséder de nombreuses propriétés bénéfiques pour la santé, telles que la protection contre l'ostéoprose, certains types de cancers, des maladies pulmonaires et cardiovasculaires (Boots et al., 2008). De plus, de nombreuses études *in vivo* ont également montré des propriétés antidiabétiques (Kim et al., 2011), anti-inflammatoire (Bureau et al., 2008), antihistamique (Park et al., 2008) et même de bonnes propriétés antivirales (Formica et Regelson, 1995).

Cependant, Williams et al. (2004) ont aussi suggéré que les effets santé associés à la quercétine n'est pas seulement liés à sa capacité de piéger des radicaux libres dans son environnement, mais aussi à sa présence à certains sites dans l'organisme où elle peut interagir avec des molécules tels des récepteurs, des enzymes ou des facteurs de transcription.

La quercétine présente donc de nombreuses activités potentielles mais son utilisation per os est cependant limitée car elle a une faible biodisponibilité, due à sa faible solubilité (Joshi et al., 2011).

2.2. Vanilline

2.2.1. Origine

La vanilline est parmi les composants multiples de l'arôme naturel de la vanille, le plus important et le plus caractéristique (Bouthin, 2005). La vanille, genre *Vanilla*, est le fruit du vanillier, plante appartenant à la famille des Orchidacées (Lüttge et al., 1996). Principalement produite à partir de l'espèce mexicaine, *Vanilla planifolia*, la vanille est la deuxième épice la plus chère au monde après le safran (Portères, 1954; Soto Arenas, 2003).

Elle est massivement utilisée par l'industrie agroalimentaire, qui s'en sert pour aromatiser les pâtisseries, les crèmes glacées, les boissons et diverses autres préparations (Othmer, 2005 ; Havkin-Frenkel et Belanger, 2011). La vanille est également utilisée comme intermédiaire de synthèse dans l'agrochimie et la production pharmaceutique (Mathias, 1993; Villar et al., 1997).

De nombreux composés sont présents dans les extraits de vanille. La vanilline (4-hydroxy-3-méthoxy-benzaldéhyde) est le composé principalement responsable de la saveur et l'arôme caractéristique de la vanille. Elle a fait l'objet de nombreuses études. Ainsi en 1858, GOBLEY identifia et isola la vanilline pour la première fois (Dignum et al., 2002 ; Walton et al., 2003).

Du fait de son coût d'extraction élevé, les chimistes ont mis au point un procédé de fabrication de la vanilline. Synthétisée pour la première fois en 1876 à partir de l'eugénol (extrait de l'essence de girofle) puis par Reimer à partir de gaiacol (extrait de goudrons de hêtres), elle est aujourd'hui obtenue à partir de la lignine, un déchet issu de la fabrication de pâte à papier. La vanilline ne représentant que 2% de la masse de la gousse de vanille, son extraction ne suffit pas à couvrir les besoins mondiaux. Ainsi, grâce à l'hémi-synthèse, il est alors possible de recréer la vanilline en grande quantité et à faible coût (Bouthin, 2005).

2.2.2. Propriétés physicochimiques

La vanilline (fig.21) est un aldéhyde phénol de formule brute $C_8H_8O_3$, de poids moléculaire 152,2. Elle est aussi appelée aldéhyde protocatéchique (Kumar et al., 2012).

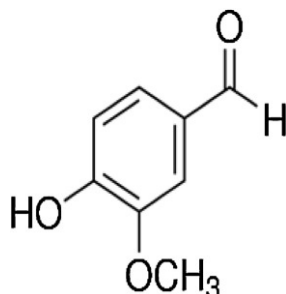


Figure 21 : Formule de la vanilline (Oliveira et al., 2014)

Elle se présente sous forme de poudre cristalline blanche à faiblement jaunâtre ou sous forme d'aiguilles cristallines. Son point de fusion est de $81^{\circ}C$ à $82^{\circ}C$ (Gildemeister et Hoffmann, 1899 ; Kumar et al., 2012).

Elle est soluble dans l'alcool, l'éther, le chloroforme et l'eau chaude mais elle est relativement soluble dans l'eau froide (Gildemeister et Hoffmann, 1899).

2.2.3. Etude toxicologique

Des études de toxicologie ont été effectuées afin de déterminer si la vanilline, devant être administrée à forte dose pour avoir les effets thérapeutiques attendus (comme nous le verrons dans les paragraphes suivants), présente un risque de toxicité.

- **Etude toxicologique chez les animaux**

L'étude a été menée sur des rats Sprague-Dawley, des administrations à fortes concentrations en vanilline par voie orale et par injection intra-péritonéale sont effectuées (Ketli et al., 2011) :

Selon cette étude, l'administration orale d'une solution à 5% d'éthanol augmente le taux de plaquettes sanguines de 63%. Cependant, l'administration orale de cette même solution d'éthanol avec 150 mg/kg de vanilline ne provoque qu'une augmentation du taux de plaquettes de 48%, et avec 300 mg/kg de vanilline le taux de plaquette reste normal. Les données indiquent que la vanilline peut affecter l'agrégation plaquettaire induite par l'éthanol.

Dans cette même étude, aucun signe de toxicité n'a été constaté au niveau du foie ou des reins après une administration orale ou intrapéritonéale de la vanilline chez le rat. En effet, la vanilline ramène le taux des différents marqueurs rénaux et hépatiques à leurs valeurs normales après que ceux-ci aient été augmentés durant le traitement avec l'éthanol. Cependant, une légère diminution du taux de Gamma-GT a été observée chez les rats ayant subi une injection de la vanilline à (150 ou 300 mg/kg). D'autre part, les tests cérébraux montrent également que la vanilline n'a eu aucun effet cérébro toxique.

Les résultats de cette étude indiquent que la vanilline pourrait contrecarrer les effets néfastes de l'éthanol et présente toutefois une toxicité faible.

- **Etude toxicologique chez l'Homme**

Chez l'homme, la toxicité de la vanille ou le vanillisme est l'ensemble des troubles susceptibles d'apparaître chez l'homme à la suite de la manipulation de la vanille ou de l'ingestion de certaines préparations culinaires à base de vanille (Nhuan, 1954).

Les symptômes du « vanillisme alimentaire » sont peu spécifiques. On retrouve des troubles digestifs à type de vomissements, de diarrhées. Ces troubles rares ne sont pas graves et disparaissent au bout d'une journée en général (Nhuan, 1954).

Le « vanillisme professionnel » est un phénomène qui s'observe particulièrement chez les ouvriers des vanilleraies (Nhuan, 1954 ; Toussaint-Samat, 1994). Il s'agit d'une phytodermatose d'origine allergique se manifestant par des éruptions érythématopapuleuses débutant au niveau des mains, des avant-bras puis gagnant la face (paupières boursoufflées, joues œdémateuses, lèvres épaissies à type d'œdème de Quincke) et certaines parties recouvertes du corps. Cette éruption très prurigineuse se généralise très vite, reste stationnaire quelques jours puis diminue d'intensité jusqu'à la guérison (Dorvault, 1995 ; Teuscher et al., 2005).

2.2.4. Les propriétés physiologiques de la vanilline

Outre ses nombreuses applications alimentaires et industrielles la vanilline a fait, ces dernières années, l'objet de nombreuses études scientifiques pour ses propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires, antimicrobiennes et également anticancéreuses. Ces actions sont en partie, attribuées à la structure phénolique de la vanilline (Oliveira et al., 2014).

La vanilline aurait démontré un effet préventif contre certains cancers. Des études tant in vitro que in vivo ont démontré que la vanilline avait la capacité d'induire l'apoptose, ou mort programmée des cellules tumorales. Ces effets ont été observés chez des cellules tumorales du colon (Ket li et al., 2012) mais aussi chez des cellules du sein (Lirdprapamongkol et al., 2005).

Aussi, la vanilline aurait un comportement qui laisse présager que son utilisation, à titre préventif ou inclus dans un traitement de maladies neurodegeneratives, pourrait être envisagé (Dhanalakshmi et al., 2015).

La vanilline posséderait aussi une activité anti-inflammatoire, par l'inhibition de la libération d'histamine et de la sérotonine, qui sont responsables de la phase initiale de l'inflammation (Niazi et al., 2014).

Mourtzinos et ses collaborateurs en (2009), ont démontré que la vanilline présenterait une activité inhibitrice contre des souches bactériennes telles que *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* et *Yersinia enterocolitica*.

Enfin, comme d'autres polyphénols, la vanilline est proposée comme antioxydant. Plusieurs études le démontrent in vitro (Oliveira et al., 2014 ; Krishnasree et Andallu, 2013) ou in vivo (Al Asmari et al., 2016 ; Makni et al., 2012 ; Makni et al., 2011 ; Kamat et al., 2000).

Cette propriété antioxydante a été testée sur des érythrocytes des rats in vivo. Il a été démontré que la vanilline inhibe la peroxydation lipidique des membranes des érythrocytes induite par le tétrachlorure de carbone (Makni et al., 2012).

L'administration de vanilline (150 mg/kg) une fois par jour pendant trois jours successifs précédant celle de tétrachlorure de carbone supprime l'augmentation du taux de peroxydes lipidiques dans le foie des rats (Makni et al., 2011).

La vanilline a montré un effet protecteur sur la formation de lésions gastriques lorsqu'il est administré per os à des rats (50, 100, 200 mg/kg). Grâce à sa capacité de piéger les radicaux libres, la vanilline avérée efficace pour diminuer le stress oxydatif induit par l'éthanol (Al Asmari et al., 2016).

Lors de divers tests évaluant la capacité anti-oxydante, la vanilline présente une activité équivalente à la vitamine C (Kamat et al., 2000).

CHAPITRE III. PESTICIDES

III. Pesticides

1. Définition et utilisation

Depuis la révolution industrielle, l'exploitation des terres agricoles s'intensifie au rythme de la croissance exponentielle de la population mondiale. La mécanisation et la modernisation des techniques de travail ont favorisé l'augmentation de la production agricole répondant ainsi à une demande de plus en plus forte. En plus de ces progrès technologiques, l'agriculture se dote aujourd'hui de produits chimiques plus performants afin de contrôler les pertes de récoltes qui sont associées à la présence de plantes ou d'insectes nuisibles (Nauen et Bretschneider, 2002).

Parmi ces produits chimiques, il se trouve que les pesticides jouent un rôle de premier plan dans la protection des végétaux contre les organismes nuisibles (Sarwar et Salman, 2015). Ces pesticides sont, en effet, des substances xéno-biotiques utilisées en agriculture pour combattre les ravageurs, les maladies et les mauvaises herbes (Van Der Werf et Zimmer, 1998).

Couramment appelés produits phytosanitaires, les pesticides ont définis par la directive européenne 91/414/CEE comme étant des substances actives ou préparations contenant une ou plusieurs substances actives, qui remplissent un ou plusieurs objectifs destinées à :

- protéger les végétaux contre tous les organismes nuisibles (en curatif ou en préventif);
- réguler la croissance des végétaux ;
- assurer le stockage et la conservation des produits végétaux;
- détruire les végétaux indésirables, freiner ou prévenir une croissance indésirable des végétaux.

La protection des cultures à l'aide des produits phytosanitaires est donc un des moyens pour l'agriculteur de lutter contre les ravageurs et ennemis de ses cultures. Il est cependant à noter qu'une protection n'est jamais totale, elle vise plutôt à limiter les pertes (Testud et al., 2007).

D'autre part, les pesticides sont également utilisés dans de nombreuses autres activités professionnelles (traitement du bois, des textiles, des matériaux ; désinsectisation; usages vétérinaires...) ainsi que pour des usages domestiques et de jardinage. Toutefois, les aspects

agricoles sont d'ailleurs les plus importants, puisque l'agriculture concentre 95 % des usages de pesticides (Thevenot, 2015).

2. Classification

Les pesticides disponibles aujourd'hui sur le marché sont caractérisés par une telle variété de structure chimique, de groupes fonctionnels et d'activité que leur classification est complexe. D'une manière générale, ils peuvent être classés en fonction de la nature de l'espèce à combattre (1^{er} système de classification) mais aussi en fonction de la nature chimique de la principale substance active qui les compose (2^{ème} système de classification) :

Selon le premier système de classification, il existe principalement trois grandes familles de produits phytosanitaires (Regnault-Roger, 2005) :

- **Les herbicides** : ce sont les plus utilisés en tonnage et en surface ; ils permettent d'éliminer les mauvaises herbes adventices des cultures. Ils appartiennent à plus de 35 familles chimiques.

- **Les insecticides** : ce sont les premiers pesticides utilisés, destinés à détruire les insectes nuisibles.

- **Les fongicides** : ils permettent de lutter contre les maladies cryptogamiques qui causent de graves dommages aux végétaux cultivés, servant à combattre la prolifération des champignons pathogènes.

À celles-ci s'ajoutent des produits divers tels que les acaricides (contre les acariens), les nématicides (contre les nématodes), les rodenticides (contre les rongeurs), les taupicides (contre les taupes), les molluscicides (contre les limaces et les escargots), les corvicides et les corvifuges (contre les corbeaux et les oiseaux ravageurs de culture).

Selon le deuxième système de classification, les principaux groupes chimiques comprennent les organochlorés, les organophosphorés, les carbamates, les pyréthrinoïdes, les triazines et les urées substituées. Ce deuxième système de classification ne permet pas de définir de manière systématique un composé. Certains pesticides peuvent être composés de plusieurs fonctionnalités chimiques. Ils peuvent alors être classés dans une ou plusieurs familles chimiques (Calvet et al., 2005).

Il existe actuellement plus de 80 familles ou classes chimiques dont les structures caractéristiques de certaines de ces familles sont présentées en figure 22 (Cavlet, 2005) :

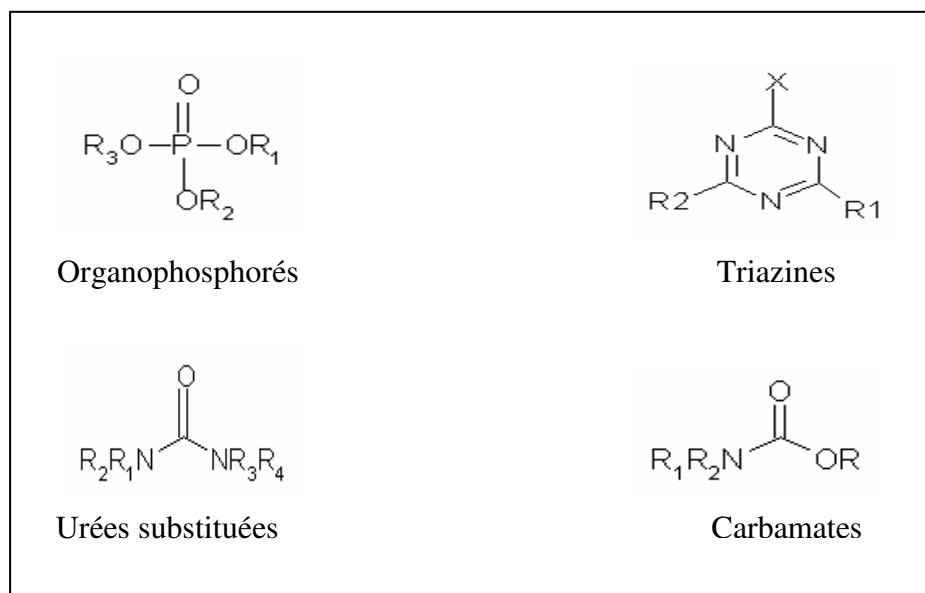


Figure 22 : Structures chimiques des principales familles des pesticides (Cavlet, 2005).

3. Mode d'action des pesticides

Les modes d'action des pesticides sont divers. Les insecticides tuent les insectes ou empêchent le déroulement normal d'une des fonctions essentielles de leur cycle de vie (éclosion des oeufs par exemple). Les fongicides s'attaquent aux spores des champignons en empêchant leur germination ou bloquent les divisions cellulaires des champignons. Enfin, les herbicides sont destinés à empêcher l'installation d'espèces végétales concurrentes dans les champs de culture en pénétrant par exemple dans la plante par ses racines (Severin et Tissut, 1991).

4. Impacts des pesticides sur l'environnement et la santé humaine

4.1. Effets sur l'environnement

L'utilisation des produits phytosanitaires a permis d'augmenter considérablement les rendements agricoles en réduisant les pertes dues aux ravageurs des cultures, mais cela n'a pas été sans contre partie. Sur ces pesticides appliqués dans les cultures, une quantité non négligeable se disperse dans l'environnement. Selon certains auteurs, moins de 0,3% des

substances déversées atteindrait réellement les organismes cibles, le reste contaminant les sols, l'eau et l'atmosphère (Pimentel, 1995 ; Van Der Werf, 1996, Tron et al., 2001).

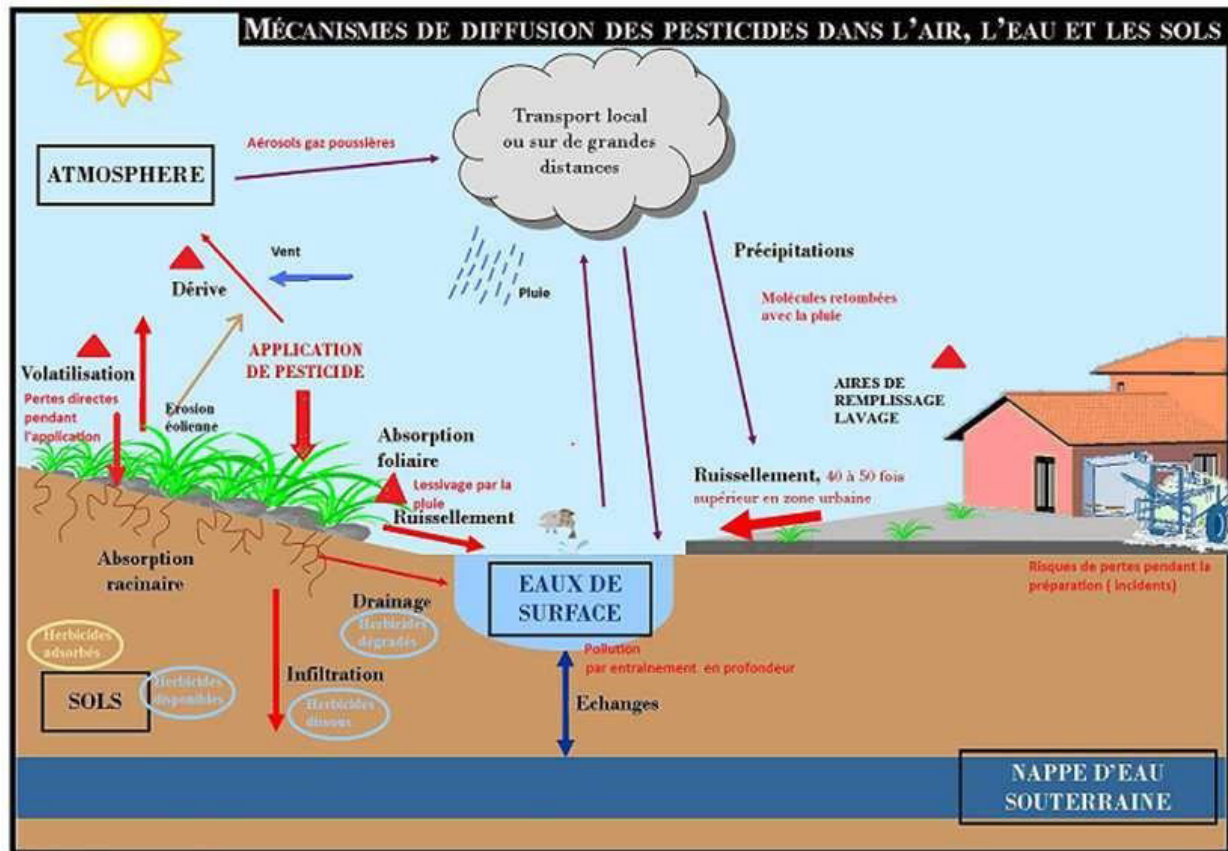


Figure 23: Processus de diffusion des pesticides dans l'environnement (Aubertot et al., 2005).

Les produits phytosanitaires se dispersent dans l'environnement au moment de l'application, selon différentes voies de transfert (fig.23). Ils peuvent se volatiliser et être transportés avant de retomber sous forme de dépôts secs ou humides. Ils vont également s'adsorber dans le sol et s'infiltrer vers les eaux souterraines. Les phytosanitaires contaminent les eaux de surface essentiellement par des phénomènes de ruissellement des eaux de pluies (Berenzen et al., 2005).

Toutefois, la dispersion et le comportement des pesticides dans l'environnement dépendent de nombreux paramètres inhérents aux substances elles-mêmes (solubilité, pression de vapeur...), au mode d'application (dispersion aérienne versus rampes d'épandage au sol)

mais également à l'environnement (type de sol, climat, distances aux rivières...) (Sánchez-Bayo et al., 2002 ; Arias-Estévez et al., 2008).

Une fois dispersés dans l'environnement, certains pesticides peuvent être dégradés par la lumière ou les micro-organismes, tandis que d'autres persistent et peuvent s'accumuler ou se transformer en d'autres contaminants parfois plus à risque que le produit d'origine (Comité permanent de l'environnement et du développement durable, 2000).

Du fait du phénomène de bioaccumulation, les pesticides sont également retrouvés dans de très nombreux organismes, dont ceux qui sont consommés, comme les fruits, les légumes, les céréales et les produits d'origine animale, sous leur forme originale ou dégradée (ORP, 2010). Les apports de pesticides peuvent donc présenter des risques de toxicité pour des organismes vivants qui n'étaient pas visés par le traitement phytosanitaire (Maroni et al., 2000).

Généralement, les risques attribuables aux pesticides sont cependant difficiles à circonscrire vu le nombre élevé d'organismes vivants, leur sensibilité différente aux pesticides, la grande diversité des milieux et des pesticides employés, ainsi que la difficulté de recenser les effets engendrés. Certains cas liés aux effets de ces produits sur les communautés benthiques (Richard et Giroux, 2004), les amphibiens (Aubertot et al., 2005, Bérubé et al., 2005), les poissons (Gendron et Branchaud, 1997, Dorval et al., 2005), les oiseaux (Mitre et al., 2011) et les mammifères (Chaturvedi et al., 2013) ont cependant été étudiés.

4.2. Effets sur la santé

• Exposition

L'exposition de l'homme aux pesticides se caractérise par une multiplicité des voies d'exposition (fig.24). Ces substances peuvent pénétrer dans l'organisme par contact cutané, par ingestion et par inhalation (Unsworth et al., 1999).

Les chiffres de l'OMS indiquent que la contamination des aliments par les pesticides est la voie d'exposition de loin la plus importante. Les évaluations de risque attribuent (90 %) de l'exposition à l'alimentation contre (10 %) à l'eau et une part moindre à l'air (17%) (Gérin et al., 2003).

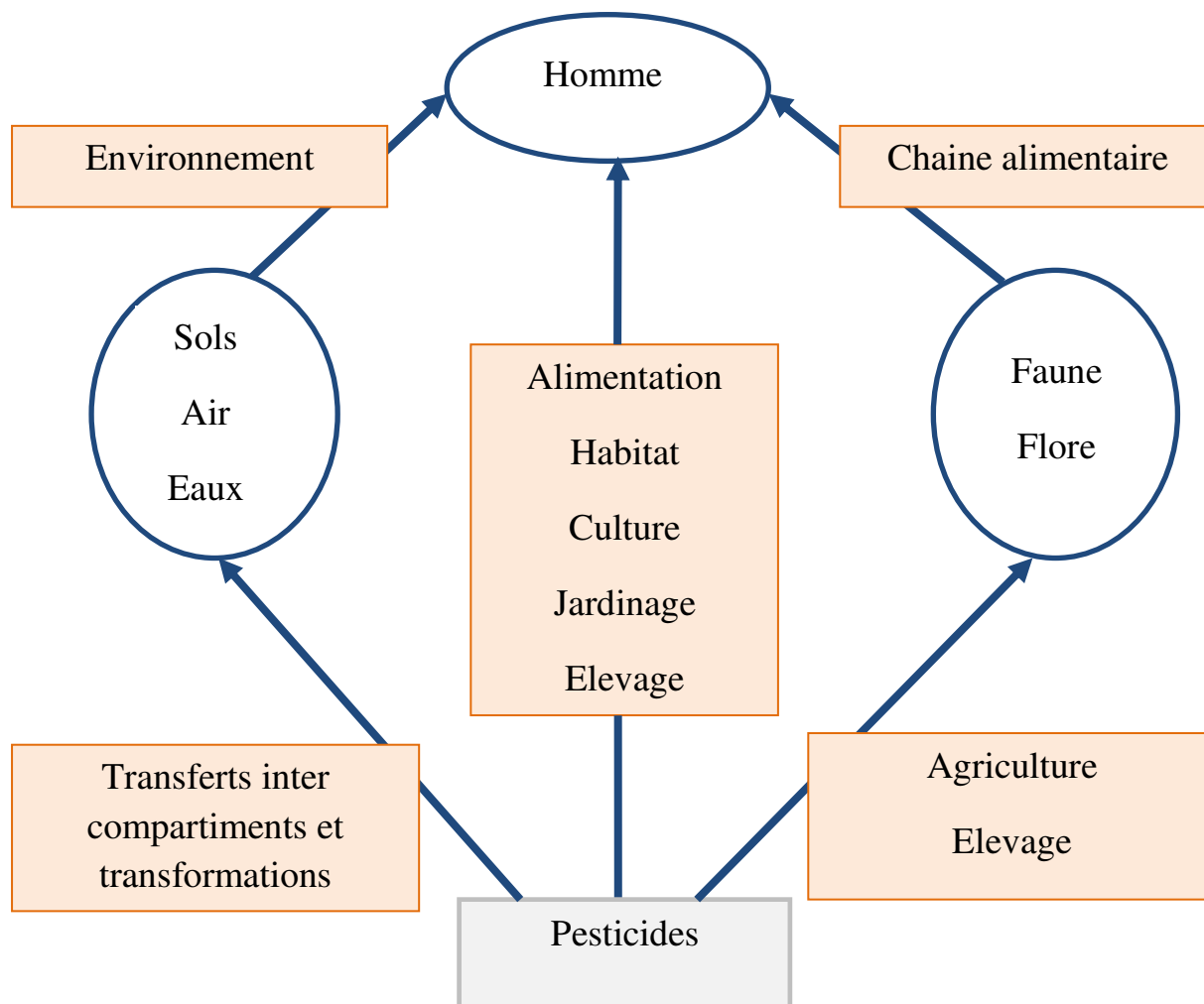


Figure 24: Modes d'exposition de l'homme et des milieux par les pesticides

(CPP, 2002).

Les effets néfastes des pesticides peuvent se manifester immédiatement ou à court terme après l'exposition ou à la suite d'absorption répétée, sur une longue période, de faibles doses de pesticides. Dans le premier cas, on parlera d'intoxication aiguë alors dans le second, on fait une référence à une intoxication chronique (Onil, 2005).

- **Toxicité aiguë**

La toxicité aiguë est induite par une exposition ponctuelle à une dose importante de pesticide susceptible d'entraîner des effets immédiats ou rapprochés tels que la manipulation des produits non dilués (ORSB, 2001). La toxicité aiguë des substances chimiques est évaluée à l'aide de tests réglementaires réalisés sur des animaux de laboratoire. La notion retenue est

celle de la dose létale 50 (DL₅₀) correspondant à la quantité de matière active qui, administrée en une seule fois, par ingestion, inhalation ou voie cutanée, entraîne la mort de 50% des animaux traités.

Les principales connaissances sur les effets aigus des pesticides chez l'homme sont issues d'observations rapportées en milieu professionnel et des cas d'intoxications documentés par les centres antipoison (ORSB, 2001). Le délai d'apparition varie en fonction de la toxicité intrinsèque du produit utilisé, de la dose reçue, de la voie d'exposition et de la sensibilité de la personne. Les symptômes peuvent aller de la simple irritation à la mort (Prouvost et Declercq, 1998).

- **Toxicité chronique**

Elle survient normalement à la suite de l'absorption répétée pendant plusieurs jours, plusieurs mois et même plusieurs années, de faibles doses de pesticides qui peuvent s'accumuler dans l'organisme. Elle peut être aussi le résultat d'intoxications aiguës répétées (CRAAQ, 2005).

Les conséquences d'une exposition chronique aux pesticides sont difficiles à cerner. En effet, il peut exister une longue période de latence, de 15 à 30 ans, avant l'apparition de symptômes, comme dans le cas de certains cancers. Selon la littérature scientifique, certains pesticides peuvent avoir des effets dommageables pour les systèmes reproducteur (Oliva et al., 2001 ; Anway et al., 2005), nerveux (Baldi et al., 2001 ; Alavanja et al., 2004) et immunitaire (Salameh et al., 2006 ; Rowe et al., 2007). Les effets mutagènes et cancérigènes (Héritier et al., 2014 ; Lake et al., 2015) sont aussi du nombre.

4.2.1. Les principaux mécanismes de toxicité des pesticides

Plusieurs études expérimentales *in vitro* ont permis de montrer que certains pesticides (l'Endosulfan, la Roténone, et des organophosphorés/Chlorpyrifos), peuvent induire un stress oxydant entraînant des perturbations de processus de régulation de la survie et de la prolifération cellulaire comme par exemple certaines voies de signalisation cellulaire (MAPkinase, FAS/TNF) et certaines caspases (Ledirac et al., 2005; Lee et al., 2008; Saulsbury et al., 2008). Il a été montré que des effets neurotoxiques (Drechsel et Patel, 2008; Rio et Velez-Pardo, 2008), immunotoxiques (Li et Kawada, 2006) ainsi que des effets cancérigènes (Antherieu et al., 2007) et génotoxiques (Bagchi et al., 1995; Calviello et al.,

2006) étaient liés à une augmentation de la libération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) en présence des pesticides.

Une augmentation des aberrations chromosomiques *in vitro* chez des lymphocytes humains a été observée en présence de certains pesticides tels que le Carbofuran, seul (Naravaneni et Jamil, 2007) ou en mélange avec l'Endosulfan et le Monochrotophos (Das et al., 2007). De plus, sur des cellules mammifères, l'Alachlore, le Chlorpyrifos, le Mancozèbe et le Monochrotophos ont montré une augmentation des aberrations chromosomiques (Bagchi et al., 1995; Calviello et al., 2006) et des bases oxydées de type 8-OH-dG (Calviello et al., 2006) ainsi qu'une présence de micronoyaux (Peitl et al., 1996).

Par ailleurs, certains pesticides comme les carbamates et les organophosphorés provoquent une inhibition de l'activité de l'acétylcholinestérase au niveau du système nerveux périphérique ou central entraînant une hyperexcitabilité des cellules neuronales et des effets potentiellement neurotoxiques (Moser, 2007). Une inhibition de la neurotransmission provoquée par la diminution de l'activité de l'acétylcholinestérase cérébrale a également été liée à une suppression de la sécrétion d'hormones stimulant les gonades (e.g, hormone de stimulation folliculaire (FSH) et hormone lutéinisante (LH) pouvant entraîner des effets sur la fertilité (Lyons, 2000).

De plus, certains pesticides comme le Lindane, l'Endosulfan, la Dieldrine et l'Eldrine peuvent entraîner une inhibition des récepteurs GABAergiques et une activation des récepteurs glutaminergiques dans les cellules neuronales de mammifères, induisant un syndrome d'hyperexcitabilité qui peut évoluer jusqu'à l'apparition de convulsions (Sunol et al., 2008). Cependant, la plupart de ces études utilisent des doses relativement fortes et les effets à faibles doses sont moins bien décrits.

5. Le pesticide étudié : la métribuzine

Le choix a été porté sur la métribuzine, herbicide fréquemment utilisé par les agriculteurs en Algérie.

5.1. Présentation

La métribuzine est un herbicide de la famille des triazines (Davis et al., 1991). Elle est commercialisée sous le nom de SENCOR (Viswanathan, 2001) et sous forme de poudre soluble dans l'eau, de spécialité commerciale à base de métribuzine à 70g de matière active

par 100g d'herbicide (Quesada-Molina et al., 2007). Sa formule développée est représentée par la figure 25 :

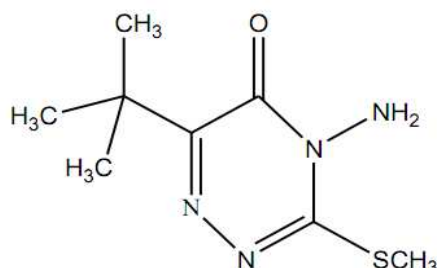


Figure 25 : Structure chimique de métribuzine (Tutunaru et al., 2015)

- **Famille chimique** : Triazine
- **Matière active** : Métribuzine
- **Le nom commercial** : Sencor, Lexone, Preview
- **Le nom chimique** : 4-amino-6-tert -butyl-4,5-dihydro-3-methylthio-1,2,4-triazin-5-one
- **La forme moléculaire**: C₈H₁₄N₄OS
- **La masse moléculaire**: 214.3 g (Kitous et al., 2009)

5.2. Utilisation et mode d'action

La métribuzine est employé en prélevée et en post-levée pour lutter contre les mauvaises herbes qui parasitent diverses cultures agricoles (Ara et al., 2016). Elle été utilisé pour combattre les graminées ainsi que dicotylédones dans les fèves de soja, les pommes de terre, les tomates, la canne à sucre et de luzerne.

En Algérie, environ 95 000 ha de pommes de terre sont cultivés chaque année, avec la métribuzine appliquée à trois quarts de la terre principalement au cours de prélevée contre les graminées et les mauvaises herbes (Yahiaoui et al., 2011).

Les triazines pénètrent essentiellement par les racines et exercent leur action au niveau des feuilles en bloquant la photosynthèse après un transport par la sève brute (Majumbdar et Singh, 2007).

5.3. Propriétés physico-chimiques

La métribuzine est un composé solide, cristallin blanc avec une légère odeur de soufre (Yahiaoui et al., 2011). Il présente une haute solubilité dans l'eau et un faible potentiel d'adsorption, qui est inversement liée au pH du sol.

La métribuzine est très soluble dans la plupart des solvants organiques y compris de l'acétone et du méthanol. Les principales caractéristiques physico-chimiques de ce produit sont présentées par le tableau 4.

Tableau 4 : Les propriétés physico-chimiques de la métribuzine (Worthing et Walker, 1987).

Apparence	Blanche, solide cristallin
Odeur	Odeur sulfureuse
La densité	1.28
Pression de vapeur	1.3×10^{-3} Pa.
Coefficient de partage	1.7
Point de fusion	T = 125°C
pKa	1.0
LD₅₀ (mg/Kg)	1090-2300
Solubilité	1,2 g/L à 20°C dans H ₂ O, les solvants organiques: Acétate d'éther de glycol ; en diméthylformamide 1780 mg/l; cyclohexanone 1000 mg/l; chloroforme 850 mg/l; acétone 820 mg/l; méthanol 450 mg/l; dichlorométhane 340 mg/l, benzène 220mg/l, n-butanol 150 mg/l; éthanol 190g/l; toluène 87 mg/l; xylène 90 mg/l; n-hexane 1 mg/l.

Tous ces caractéristiques apportent à la métribuzine une grande mobilité dans le sol (Landgraf et al., 1998). Par conséquent, il est peu probable que cette substance produise une bioaccumulation importante (Ayranci et Numan, 2004).

5.4. Devenir dans l'environnement

Au niveau de sa dispersion dans l'environnement, la métribuzine présente une persistance modérée dans le sol. Sa demi-vie est d'environ soixante jours et varie selon le type de sol et les conditions climatiques (Wauchope et al., 1992). Son grand potentiel à se lixivier dans les sols limoneux ou sableux s'explique par la faible présence des minéraux. Au cours des périodes climatiques froides, la métribuzine est lixiviée à des couches plus profondes de sol, car l'activité biologique est minime et la capacité d'adsorption des pesticides par le sol est généralement faible (Stenrod et al., 2008).

Aujourd'hui, les herbicides sont reconnus comme des substances chimiques relativement dangereuses pour les écosystèmes (Fortier et Messier, 2005). Selon l'agence de protection de l'environnement (EPA), la métribuzine fait partie des pesticides qui ont un grand potentiel de contamination des eaux souterraines (Ayranci et Numan, 2004), son degré de lixiviation dans la nappe phréatique est, une fonction inversement proportionnelle à la teneur du sol en matière organique (Majumdar et Singh, 2007 ; Stenrod et al., 2008). Sa demi-vie dans l'eau est d'environ sept jours (Majumdar et Singh, 2007).

La décomposition de la métribuzine dans l'environnement est due en grande partie aux processus microbiologiques et chimiques (Stenrod et al., 2008 ; Huertas-Pérez et al., 2006). Cependant, la métabolisation microbienne demeure le principal mécanisme d'élimination de cette substance dans le sol. Les pertes par la volatilisation et/ou photodégradation sont négligeables (Quesada-Molina et al., 2007).

5.5. Mode d'action et toxicité de la métribuzine

La métribuzine herbicide largement utilisé dans le monde, est l'une des contaminants les plus importantes des eaux souterraines et de surface (López-Piñeiro et al., 2013). Elle est classée dans la catégorie des herbicides lesquels, par inhalation ou pénétration cutanée, peuvent entraîner des risques de gravité limitée, elle est nocive en cas d'ingestion (EPA, 2003). Le tableau ci-dessous donne la DL₅₀ de la métribuzine pour des rongeurs soumis à différentes expositions.

Après absorption, la métribuzine est rapidement distribuée dans tout le corps et est ensuite excrétée dans l'urine et les fèces. Toutefois, selon les recherches effectuées, la distribution de la métribuzine chez l'humain et l'animal n'est pas complètement comprise (Maslamani, 2016). Sa DJA est de 0.025 mg/Kg/jour (Bayer, 1990).

Tableau 5: Différentes DL₅₀ pour les rongeurs (Bayer, 1990).

Type d'exposition	DL ₅₀
Aigüe orale/ Rat	2000 mg/kg
Aigüe dermique/ Lapin	> 2000 mg/kg
Aigüe inhalation/ Rat	< 648 mg/m ³

Ce composé exerce des effets toxiques aigus et chroniques chez divers organismes. Les mécanismes par lesquels la métribuzine induit de tels effets reste encore à élucider. Néanmoins, la synthèse des données issues d'études toxicologiques a démontré que la métribuzine était capable d'induire un stress (Medjdoub et al., 2011 ; Chiali et al., 2013 ; Maksymiv et al., 2015).

Comme certains pesticides, la métribuzine a pour effet d'augmenter le stress oxydatif, résultant d'excès d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). Selon l'étude de (Chiali et al., 2013), cette surproduction d'ROS pourrait donc être à l'origine d'effet pro-oxydant de la métribuzine dont pourraient résulter des réactions d'oxydation, et dont les macromolécules telles que les protéines et les phospholipides membranaires sont les principales cibles. Dans cette étude, ces effets pro-oxydants sont observés dans les organes (foie, tissu adipeux, muscles et intestin) des rats mâles et femelles exposés aux faibles doses de métribuzine.

Ainsi, le stress oxydant lié à l'exposition au métribuzine serait à l'origine de la perturbation du système immunitaire (cellules spléniques humaines ou de rat en culture). La métribuzine diminue la prolifération de lymphocytes en culture avec une perturbation de l'activité de certaines enzymes impliquées dans la défense cellulaire antioxydante (inhibition des activités superoxyde dismutase et catalase). Des dommages à l'ADN dans les cellules en culture exposées ont été rapportés (Medjdoub et al., 2011).

Chez le poisson (*Carassius auratus* L), des phénomènes oxydatifs ont également été rapportés par Maksymiv et al. (2015) lors d'évaluation du statut antioxydant (SOD, GPX, GST, GR) au niveau des organismes exposés à la métribuzine par voie orale.

Il semble donc que les études toxicologiques concernant la métribuzine, apportent des arguments en faveur d'une plausibilité de la relation de causalité entre l'exposition à la métribuzine et l'apparition de certains troubles.

PARTIE PRATIQUE

CHAPITRE I. MATÉRIEL ET MÉTHODES

I. Matériel et méthodes

1. Matériel biologique et conditions d'élevage

Nous avons utilisé 48 rats mâles *Rattus rattus* de la souche Wistar, provenant de l'institut pasteur d'Alger. Ce sont des mammifères de l'ordre des rongeurs, largement utilisés dans divers domaines de recherche. Ces rats ont été soumis à une période d'adaptation d'un mois environ, aux conditions de l'animalerie, à une température ambiante et une photopériode naturelle.

Les rats sont élevés dans des cages en polyéthylène qui sont tapissées d'une litière constituée de copeaux de bois. Les cages ont été nettoyées et la litière est renouvelée trois fois par semaine jusqu'à la fin de l'expérimentation. L'élevage de ces animaux ainsi que les différents tests ont été réalisés au sein de l'animalerie du Département de Biologie, Faculté des Sciences, Université Badji Mokhtar-Annaba, Algérie.

Durant cette période, les rats ont été nourris avec un concentré énergétiquement équilibré, dont la composition est détaillée dans le tableau 6. Quant à l'eau de boisson, elle est présentée dans des biberons ad libitum.

Tableau 6 : Composition de l'alimentation pour 1 kilogramme d'aliment.

Matière alimentaire	Quantité en g/kg d'aliment
Mais	620
Soja	260
Phosphate	16
Calcaire	9
Cellulose	10
Minéraux	10
Vitamines	10

2. Méthodes

2.1. Traitement des rats

Cette expérimentation vise à étudier l'effet d'une supplémentation en polyphénols dont la quercétine et la vanilline sur la toxicité induite par le traitement des rats avec la métribuzine.

La présente étude va nous permettre d'une part d'évaluer le rôle protecteur des polyphénols et d'apprécier d'autre part les critères cliniques (poids), biologiques (hématologie et biochimie) ainsi que l'état oxydatif et l'examen histologique des différents organes (foie et rein) suite à une exposition des rats pendant 21 jours au métribuzine.

2.1.1. Administration de la quercétine et la vanilline

La quercétine et la vanilline ont été dissoutes dans le sérum physiologique (NaCl, 0,9%) puis administrées aux rats par injection intrapéritonéal à raison de 50 et 150 mg/kg de poids corporel/jour, respectivement. Cette administration a été adoptée des études précédentes ayant démontré leurs efficacités chez les rats (De Oliveira et al., 2014 ; Makni et al., 2011).

2.1.2. Administration de la métribuzine

La métribuzine a été dissoute dans l'eau puis administrée par voie orale à raison de 133,33 mg/kg de poids corporel. Cette dose représente 1/20 de la dose létale 50 (2345 mg/kg) de la métribuzine chez les rats (Xhaxhiu et al., 2013).

2.1.3. Procédure expérimentale

Les quarante-huit rats mâles ont été répartis de façon à avoir un poids moyen par groupe égal, en six groupes expérimentaux de huit rats chacun (n = 8) et ont reçu les traitements suivants:

Le groupe contrôle ou le groupe témoin (T): a reçu comme eau potable de l'eau du robinet et une injection intrapéritonéal de 1 ml de sérum physiologique (NaCl, 0,9%).

Le groupe Que: a reçu durant 21 jours, par voie intra-péritonéale, 1 ml d'une solution saline de Que à raison de 50 mg/kg /jour.

Le groupe Va : a reçu durant 21 jours, par voie intra-péritonéale, 1 ml d'une solution saline de Va à raison de 150 mg/kg /jour.

Le groupe Mtz: a reçu durant 21 jours, par voie orale, la métribuzine à raison de 133,33 mg/kg/jour.

Le groupe Mtz+Que: a reçu une injection intra-péritonéale de Que (1ml) et une administration orale de Mtz quotidienne pendant 21 jours.

Le groupe Mtz+Va: a reçu une injection intra-péritonéale de Va (1ml) et une administration orale de Mtz quotidienne pendant 21 jours.

Au cours de cette expérimentation, le poids corporel des animaux a été mesuré une fois par semaine pendant toute la durée de l'expérience (3 semaines) et le jour du sacrifice.

3. Sacrifices et prélèvements des organes

3.1. Prélèvement sanguin

Après 21 jours de traitement, les rats de chaque groupe ont été sacrifiés par décapitation sans anesthésie et leur sang a été recueilli dans des tubes héparinés pour la détermination de l'FNS (Formule de Numération Sanguine). Les lectures ont été prises rapidement au compteur automatique de cellules sanguines PCE-210N multiparamètres (18 paramètres; Erma, Tokyo, Japon).

En outre, le sang de chaque animal a été recueilli dans des tubes secs qui sont ensuite centrifugés à 5000 tours /minute pendant 15 minutes. Le sérum est séparé en trois fractions dans des tubes Eppendorf puis mis au congélateur jusqu'au moment des dosages biochimiques (glucose, créatinine, urée, bilirubine totale, cholestérol, triglycérides, transaminases et phosphatase alcaline).

3.2. Prélèvement des organes

Après incision de la paroi abdominale, le foie, les reins, le cerveau et les testicules sont prélevés puis lavés en solution saline physiologique (NaCl 0,9%). Après avoir pesé, une partie du prélèvement de chaque organe (foie et reins) est fixé en formaldéhyde 10% (V/V) pour l'étude histologique.

A partir d'un second fragment, un certain nombre de marqueurs (MDA, GSH et GPX) dont les taux renseignent sur « l'état oxydatif », sont dosés dans chaque organe.

La figure 26 schématise les différentes étapes du protocole expérimental utilisé dans notre étude.

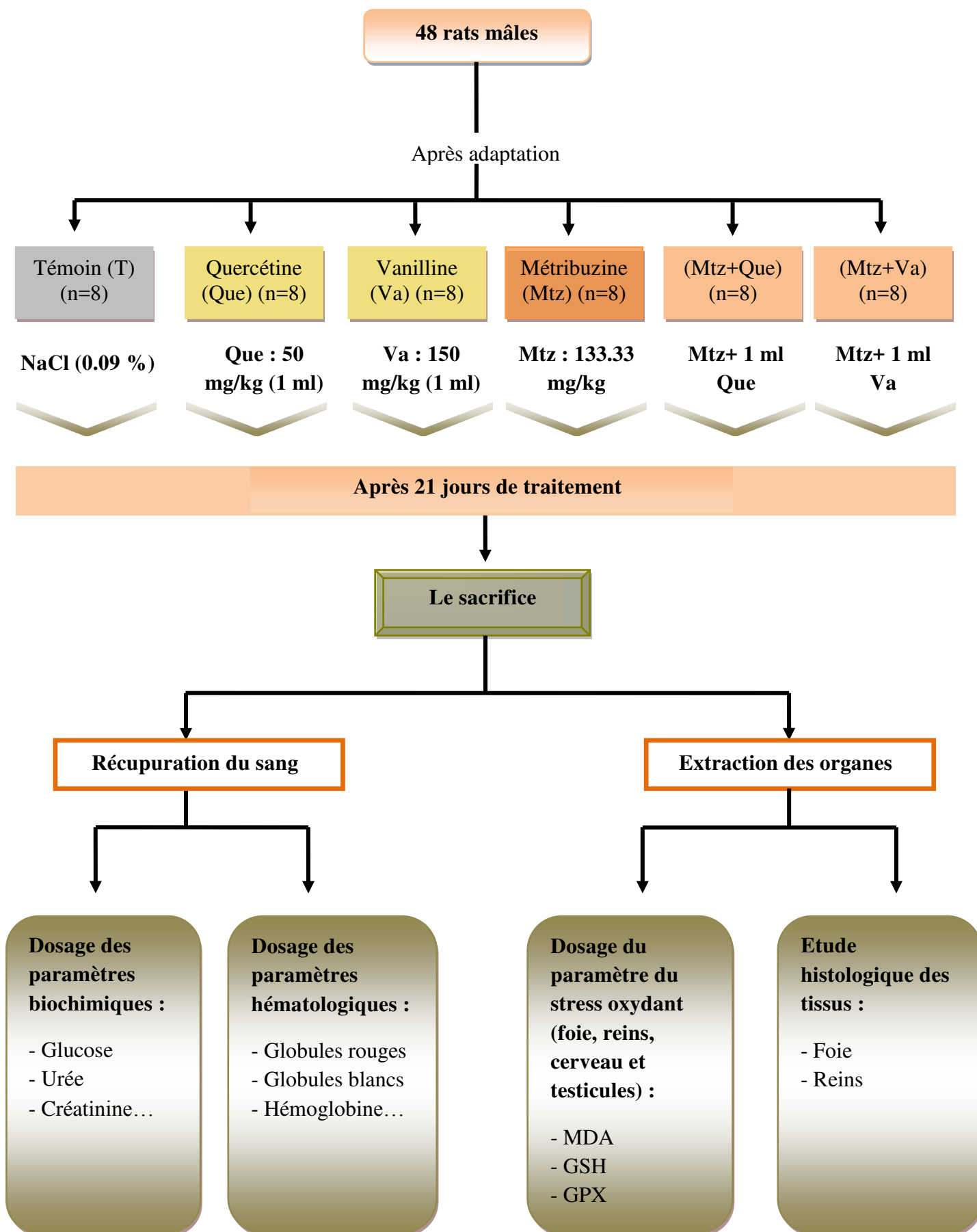


Figure 26 : Schéma récapitulatif du protocole expérimental.

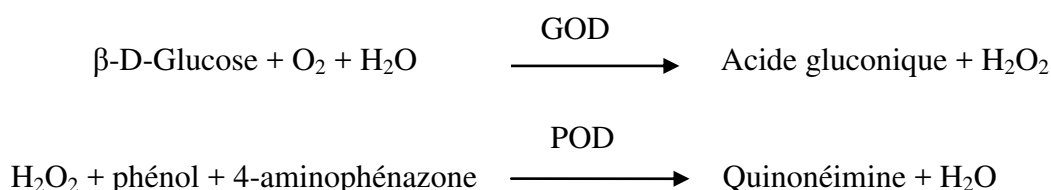
4. Méthodes de dosage des paramètres biochimiques

4.1. Dosage du glucose

La détermination de la glycémie a été réalisée par la méthode enzymatique au glucose oxydase selon la fiche technique (Spinreact).

4.1.1. Principe

Le glucose est transformé par le glucose oxydase (GOD) en acide gluconique et peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Ce dernier, en présence de peroxydase (POD), oxyde le chromogène incolore (4-aminophénazone) en un composé coloré en rouge-violet (quinoneimine) (Trinder, 1969 ; Kaplan, 1984), selon les réactions suivantes :



4.1.2. Réactifs

Réactif 1 :	Tris pH 7.4	92 mmol/l.
tampon	Phénol	0.3 mmol/l.
Réactif 2 :	Glucose oxydase (GOD)	15000 U/L.
Enzymes	Peroxydase (POD)	1000 U/L.
	4-Aminophenazone (4-AP)	2.6 mmol/l.
Glucose calibrant	Glucose aqueous (standard)	100 mg/dl.

Réactif de travail: dissoudre le contenu de réactif 2 dans le flacon de réactif 1 et mélanger légèrement.

4.1.3. Mode opératoire

	Blanc	Etalon	Echantillon
Réactif de travail (ml)	1.0	1.0	1.0
Etalon (µl)	-	10	-
Echantillon (µl)	-	-	10

Mélanger, incuber pendant 10 min à 37 °C ou 15-20 min à une température ambiante. Lire les absorbances des échantillons et de l'étalon contre le blanc réactif à 505 nm. La coloration finale est stable au moins 30 minutes.

4.1.4. Calcul de la concentration

La concentration du glucose est calculée par la formule suivante :

$$\text{Glucose (mg/dl)} = \frac{\text{DO}_{\text{échantillon}}}{\text{DO}_{\text{étalon}}} \times \text{Concentration de l'étalon (100 mg/dl)}$$

4.2. Dosage de la bilirubine totale

La détermination de la bilirubine a été réalisée par la méthode colorimétrique (selon la fiche technique Spinreact).

4.2.1. Principe

La bilirubine réagit avec l'acide sulfanilique diazoté à pH acide pour produire l'azobilirubine. Cette réaction est instantanée avec la bilirubine directe (la bilirubine conjuguée), par contre avec la bilirubine totale (bilirubine non conjuguée), elle est indirecte nécessite la solubilisation par le diméthylsulfoxyde (DMSO). (En absence de DMSO, seule la bilirubine directe réagit). L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration de la bilirubine dans l'échantillon (Malloy et al., 1937 ; Kaplan et al., 1984).

4.2.2. Réactifs

Réactif 1 :	Acide sulfanilique	30 mmol/l.
Bilirubine totale	Acide chlorhydrique	50 mmol/l.
	Diméthylsulfoxyde (DMSO)	7 mmol/l.
Réactif 2 :	Nitrite de sodium	29 mmol/l.
Calibrant	Il est sous la référence	1002250.

4.2.3. Mode opératoire

	Blanc	BL totale
Réactif 1 : BL totale (ml)	1.5	1.5
Réactif 2 : (µl)	-	50
Echantillon/calibrant (µl)	100	100

Mélanger et lire la densité optique après 5 minutes d'incubation à une longueur d'onde 555 nm.

4.2.4. Calcul de la concentration

La concentration de la bilirubine est calculée par la formule suivante :

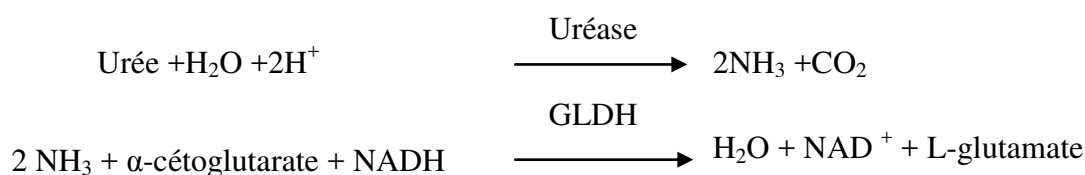
$$\text{Bilirubine totale} = \frac{\text{DO}_{\text{échantillon}} - \text{DO}_{\text{blanc échantillon}}}{\text{DO}_{\text{calibrant}} - \text{DO}_{\text{blanc calibrant}}} \times \text{Concentration de calibrant}$$

4.3. Dosage de l'urée

Le dosage de l'urée a été réalisé par la méthode cinétique enzymatique à l'uréase (Spinréact).

4.3.1. Principe

L'uréase hydrolyse l'urée en ammoniacque (NH_3) et le dioxyde de carbone (CO_2). L'ion ammonium réagit avec l'alpha-cétoglutarate en présence du glutamate déshydrogénase et du système NADH/NAD^+ servant l'indicateur, où la diminution de l'absorbance à 340 nm due à la transformation du NADH en NAD^+ . Cette diminution est directement proportionnelle à la concentration de l'urée dans l'échantillon (Kaplan, 1984), selon les réactions ci-dessous :



4.3.2. Réactifs

Réactif1:	Tris pH 7.8	80 mmol/l.
Tampon	α -cétoglutarate	6 mmol/l.
Réactif2:	Uréase	3750 U/L.
Enzymes	Glutamate déshydrogénase (GLDH)	6000 U/L.
	NADH	0,32 mmol/l.
Urée calibrant	Urée aqueous (standard)	50 mg/dl.

Réactif de travail: dissoudre le réactif 2 dans le réactif 1 et mélanger légèrement.

4.3.3. Mode opératoire

	Blanc	Étalon	Echantillon
Réactif de travail (ml)	1.0	1.0	1.0
Étalon (µl)	-	10	-
Echantillon (µl)	-	-	10

Mélanger, lire les densités optiques de l'échantillon et de l'étalon après 30 secondes (DO 1) et après 90 secondes (DO 2) à 340 nm.

4.3.4. Calcul de la concentration

La concentration de l'urée est calculée par la formule suivante :

$$\text{Urée (mg/dl)} = \frac{\Delta \text{DO}_{\text{échantillon}}}{\Delta \text{DO}_{\text{étalon}}} \times \text{Concentration de l'étalon}$$

$$\Delta \text{DO} = (\text{DO 2} - \text{DO 1})$$

4.4. Dosage de la créatinine

La détermination de la créatinine a été réalisée par la méthode cinétique colorimétrique selon la fiche technique (Spinréact).

4.4.1. Principe

L'essai est basé sur la réaction de la créatinine avec l'acide picrique, c'est la réaction de JAFFE. La créatinine réagit avec le picrate alcalin pour donner un complexe coloré, mesuré dans un intervalle de temps défini et proportionnel à la concentration en créatinine de l'échantillon (Murray, 1984).

4.4.2. Réactifs

Réactif 1 :	Acide picrique	17.5 mmol/l
Réactif 2 :	Hydroxyde de sodium	0.29 mol/l.
créatinine calibrant	créatinine aqueous (standard)	2 mg/dl.

Réactif de travail: mélanger un volume de réactif 1 avec un volume de réactif 2.

4.4.3. Mode opératoire

	Blanc	Etalon	Echantillon
Réactif de travail (ml)	1.0	1.0	1.0
Etalon (µl)	-	100	-
Echantillon (µl)	-	-	100

Mélanger, déclencher le chronomètre puis lire à 492 nm la densité optique (DO 1) après 30 secondes et la densité optique (DO 2) après 90 secondes.

4.4.4. Calcul de la concentration

La concentration de la créatinine est calculée selon la formule suivante :

$$\text{Créatinine (mg/dl)} = \frac{\Delta \text{DO}_{\text{échantillon}} - \Delta \text{DO}_{\text{blanc}}}{\Delta \text{DO}_{\text{étalon}} - \Delta \text{DO}_{\text{blanc}}} \times \text{Concentration de l'étalon}$$

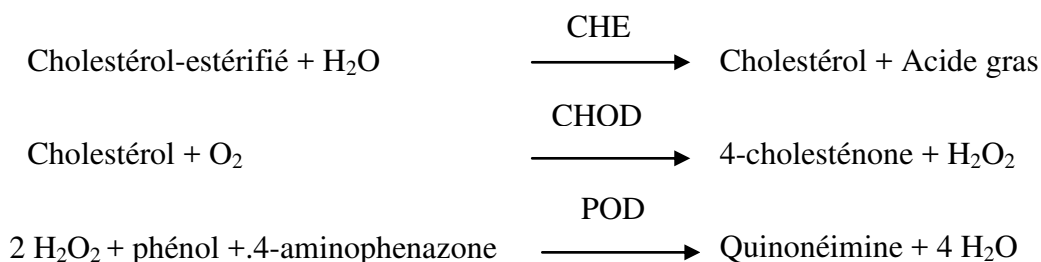
$$\Delta \text{DO} = (\text{DO2} - \text{DO1})$$

4.5. Dosage du cholestérol

Le dosage du cholestérol a été réalisé par la méthode enzymatique colorimétrique (Spinreact).

4.5.1. Principe

Le dosage du cholestérol est effectué selon la méthode enzymatique colorimétrique impliquant l'enzyme cholestérol oxydase (Naito, 1984). Les esters de cholestérol sont hydrolysés par une cholestérol estérase en cholestérol libre et en acides gras. Le cholestérol total est oxydé par une cholestérol oxydase en 4-cholesténone et en peroxyde d'hydrogène. Ce dernier, en présence de peroxydase, oxyde le 4-aminophénazone et le phénol en quinonéimine de couleur rose selon les réactions chimiques suivantes:



4.5.2. Réactifs

Réactif 1 :	PIPES pH 6.9	90 mmol/l.
Tampon	Phénol	26 mmol/l.
Réactif 2	Cholestérol estérase (CHE)	300 µ/L.
Enzymes	Cholestérol oxydase (CHOD)	300 µ/L.
	Peroxydase (POD)	1250 mmol/l.
	4-Aminophenazone	0,4 mmol/l.
Cholestérol Calibrant	Cholestérol aqueux primaire (standard)	200mg/dl.

Réactif de travail : dissoudre le contenu de réactif 2 dans le flacon de réactif 1 et mélanger légèrement jusqu'à la dissolution complète.

4.5.3. Mode opératoire

	Blanc	Etalon	Echantillon
Réactif de travail (ml)	1.0	1.0	1.0
Etalon (µl)	-	10	-
Echantillon (µl)	-	-	10

Mélanger, incuber pendant 5 min à 37 °C ou 10 min à une température de 25 °C puis lire les absorbances des échantillons et de l'étalon contre le blanc à 546 nm. La couleur est stable après 60 min.

4.5.4. Calcul de la concentration

La concentration du cholestérol est calculée par la formule suivante :

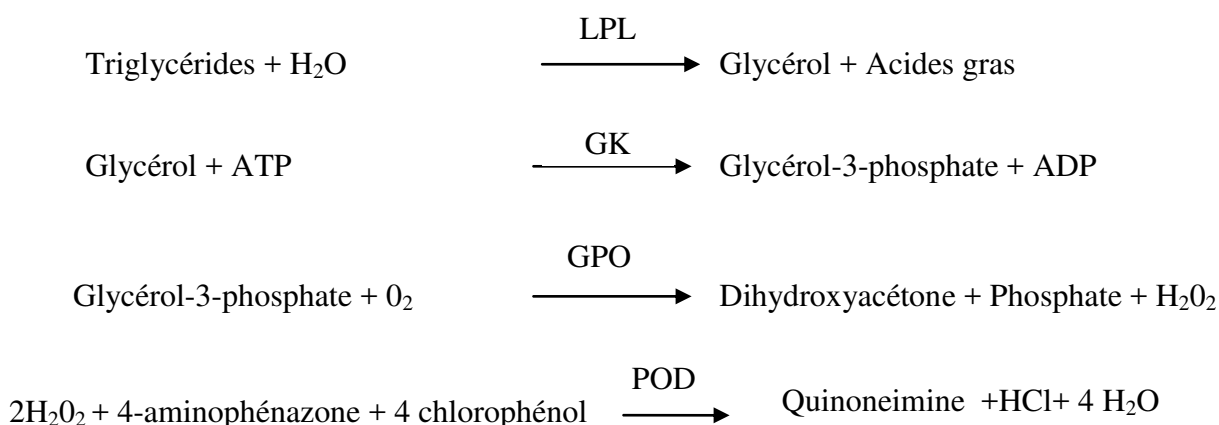
$$\text{Cholestérol (mg/dl)} = \frac{\text{DO échantillon}}{\text{DO étalon}} \times 200$$

4.6. Dosage des triglycérides

Le dosage du cholestérol a été réalisé par la méthode enzymatique colorimétrique (Spinreact).

4.6.1. Principe

Le glycérol, libéré suite à l'hydrolyse des triglycérides par la lipoprotéine lipase (LPL), est transformé en glycérol-3-phosphate grâce à l'action de la glycérokinase (GK). Le glycérol-3-phosphate subit l'action de la glycérophosphate oxydase (GPO) pour former la déhydroxyacétone phosphate et le peroxyde d'hydrogène. Celui-ci en présence de peroxydase (POD), oxyde le groupement chromogène de l' amino-4-antipirine et du chloro-4-phénol, pour former un composé coloré en rose (Kaplan et al., 1984). Les réactions chimiques sont les suivantes:



4.6.2. Réactifs

Réactif 1 :	COOD pH 7.5	50 mmol/l.
Tampon	p-Chlorophénol	2 mmol/l.
Réactif 2	Lipoprotéine lipase (LPL)	150000 µ/L.
Enzymes	Glycérol kinase (GK)	50 µ/L.
	Glycérol-3-oxydase (GPO)	2500 mmol/l.
	Peroxydase (POD)	440 mmol/l.
	4-Aminophénazone (4-AP)	0.1 mmol/L.
	ATP	0.1 mmol/L.
Triglycérides Calibrant	Triglycérides aqueux (standard)	200mg/dl.

Réactif du travail : Dissoudre le contenu d'une fiole de réactif 2 (enzymes) dans un flacon de réactif 1 (tampon).

4.6.3. Mode opératoire

	Blanc	Etalon	Echantillon
Réactif de travail (ml)	1.0	1.0	1.0
Etalon (µl)	-	10	-
Echantillon (µl)	-	-	10

Mélanger puis incuber le mélange pendant 10 minutes à température ambiante. La lecture est effectuée par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 505 nm. La coloration est stable pendant 30 minutes.

4.6.4. Calcul de la concentration

$$\text{Concentration des triglycérides (mg/dl)} = \frac{\text{DO}_{\text{échantillon}}}{\text{DO}_{\text{étalon}}} \times 200$$

4.7. Dosage des protéines totales

Le dosage des protéines a été réalisé par la méthode colorimétrique selon la fiche technique (Spinreact).

4.7.1. Principe

Les liaisons peptidiques réagissent avec les sulfates de cuivre en milieu alcalin formant une coloration violette (bleu-violet) dont l'intensité mesurée à 550 est proportionnelle à la quantité de protéines présentes dans le milieu (Koller, 1984 ; Burtis et al., 1999).

4.7.2. Réactifs

Réactif du Biuret	Tartrate de potassium sodium	15 mmol/l.
	Iodure de sodium	100 mmol/l.
	Iodure de potassium	5 mmol/l.
	Sulfate de cuivre	19 mmol/l.
Calibrant	Sérum albumine bovin (standard)	70 g/l.

4.7.3. Mode opératoire

	Blanc	Etalon	Echantillon
Réactif de travail (ml)	1.0	1.0	1.0
Etalon (µl)	-	25	-
Echantillon (µl)	-	-	25

Mélanger puis incuber pendant 5 min à 37 °C, ou 10 min à une température ambiante. Lire les densités optiques des échantillons et de l'étalon contre le blanc à 550 nm.

4.7.4. Calcul de la concentration

La concentration des protéines totales est calculée par la formule suivante :

$$\text{Protéines totales (g/l)} = \frac{\text{DO}_{\text{échantillon}}}{\text{DO}_{\text{étalon}}} \times \text{Concentration de l'étalon (70 mg/dl)}$$

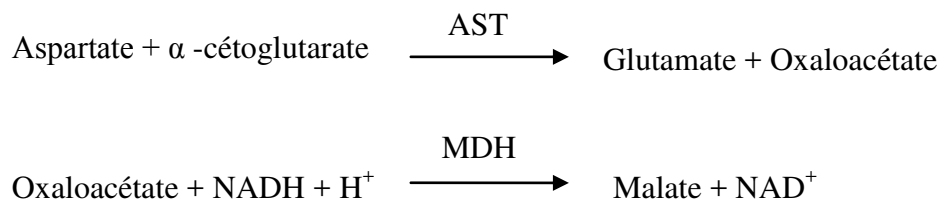
4.8. Dosage des transaminases

4.8.1. Dosage de l'aspartate aminotransférase (AST)

Pour réaliser ce dosage, nous avons utilisé des coffrets (Spinreact).

4.8.1.1. Principe

L'aspartate aminotransférase (AST) appelée aussi L'oxaloacétate de glutamate (GOT) catalyse le transfert réversible d'un groupe aminé à partir de l'aspartate au α -cétoglutarate formant le glutamate et l'oxaloacétate. L'oxaloacétate est réduit au malate par la malate déshydrogénase (MDH) et le NADH, H⁺ (Reitman, 1957; Murray, 1984):



4.8.1.2. Réactifs

Réactif 1 :	Tris pH 7.8	90 mmol/l.
Tampon	L- aspartate	200 mmol/l.
Réactif 2	NADH	0.18 mmol/L.
Substrat	Lactate déshydrogenase (LDH)	800 U/L.
	Malate déshydrogenase (MDH)	600 U/L.
	α -cétoglutarate	12 mmol/L.

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

4.8.1.3. Mode opératoire

Réactif de travail (ml)	1.0
Echantillon (μ l)	100

Mélanger puis incubé pendant une minute. Lire à 340 l'absorbance initiale et démarrer le chronomètre simultanément. Lire à nouveau après 1, 2 et 3 minutes.

4.8.1.4. Calcul de la concentration

La concentration d'aspartate aminotransférase est calculée par la formule suivante :

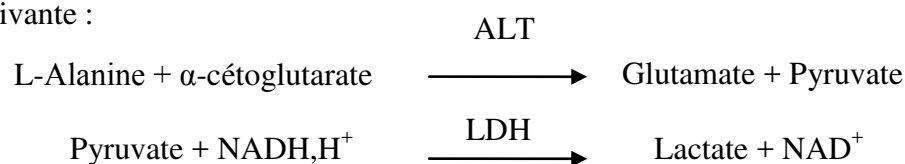
$$\text{AST (U/L)} = \Delta \text{DO/min} \times 1750$$

4.8.2. Dosage d'alanine aminotransférase (ALT)

Pour réaliser ce dosage, nous avons utilisé des coffrets (Spinreact).

4.8.2.1. Principe

L'alanine aminotransférase (ALT) appelée aussi le pyruvate de glutamate transaminase (TGP) catalyse le transfert réversible d'un groupe aminé à partir de l'alanine au α -cétoglutarate formant le glutamate et le pyruvate. Le pyruvate est réduit au lactate par la lactate déshydrogénase (LDH) et le NADH, H⁺ (Murray, 1984). Ce principe est présenté selon la réaction suivante :



4.8.2.2. Réactifs

Réactif 1 :	Tris pH 7.8	100 mmol/l.
Tampon	L- alanine	500 mmol/l.
Réactif 2	NADH	0.18 mmol/L.
Substrat	Lactate déhydrogenase (LDH)	1200 U/L.
	α -cétoglutarate	15 mmol/L.

Réactif de travail (RT) : Dissoudre le contenant du R2 dans le flacon de R1. Ce réactif est stable 2 semaines à 2-8 °C.

4.8.2.3. Mode opératoire

Réactif de travail (ml)	1.0
Echantillon (μ l)	100

Mélanger, incubé pendant une minute à température ambiante. La lecture de l'absorbance (A) des solutions après 1, 2, 3 et 4 mn d'incubation est effectuée à une longueur d'onde de 340 nm.

4.8.2.4. Calcul de la concentration

La concentration d'alanine aminotransférase est calculée par la formule suivante :

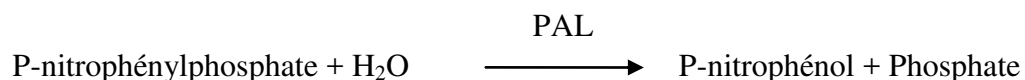
$$\text{ALT (U/L)} = \Delta \text{DO/min} \times 1750$$

4.9. Dosage de la phosphatase alcaline (PAL)

Pour réaliser ce dosage, nous avons utilisé des coffrets (Spinreact).

4.9.1. Principe

La phosphatase alcaline catalyse l'hydrolyse de p-nitrophényl phosphate à pH 10.4 pour donner le p-nitrophénol et le phosphate (Wenger et al., 1984 ; Rosalki et al., 1993), selon la réaction suivante :



La formation de p-nitrophénol est mesurée photométriquement, où elle est proportionnelle à l'activité catalytique de la phosphatase alcaline dans l'échantillon.

4.9.2. Réactifs

Réactif 1 :	Diethanolamine (DEA) pH 10.4	1 mmol/l.
Tampon	Chlorure de magnésium	0.5 mmol/l.
Réactif 2	p-nitrophényl phosphate (pNPP)	10 mmol/l.
Substrat		

Réactif de travail (RT): dissoudre une tablette de réactif 2 (substrat) dans le tampon (réactif 1).

4.9.3. Mode opératoire

Réactif de travail (ml)	1.2
Echantillon (µl)	20

Mélanger, incuber pendant une minute à une température ambiante. La lecture de l'absorbance des solutions après 1, 2 et 3 mn d'incubation est effectuée à une longueur d'onde de 405 nm.

4.9.4. Calcul de la concentration

L'activité de phosphatase alcaline exprimée en UI est donnée par l'équation suivante:

$$\text{Phosphatase alcaline (U/L)} = \Delta \text{ DO/min} \times 3300$$

5. Dosage des paramètres du stress oxydant

5.1. Préparation de l'homogénat

Un gramme de tissu (foie, rein, cerveau et testicule) de chaque rat des différents groupes étudiés, a été utilisé. Après broyage et homogénéisation des tissus dans le TBS (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7.4), la suspension est centrifugée à 9000 tours par minute pendant 15 minutes à 4°C. Le surnageant est alors récupéré dans des tubes Eppendorfs, puis conservé à -20°C jusqu'au moment du dosage.

5.2. Dosage du glutathion réduit (GSH)

La méthode de Wekbeker et Cory (1988) a été appliquée pour le dosage du glutathion dans les tissus. Le principe de ce dosage repose sur la mesure de l'absorbance optique de l'acide 2-nitro-5-mercapturique. Ce dernier résulte de la réduction de l'acide 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoïque (DTNB) par les groupements (-SH) du glutathion. Pour cela, une

déprotéinisation de l'homogénat est indispensable afin de garder uniquement les groupements thiol spécifiques du glutathion.

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 sulfosalicylique (0.25%).

Après agitation durant 15 mn dans un bain de glace:

- ✓ Centrifuger à 1000 tours/min pendant 5 min.
- ✓ Prélever 0.5 ml du surnageant. Ajouter 1 ml du tampon Tris, pH 9.6. Mélanger et ajouter 0.025 ml de l'acide 5,5 dithio-bis-2-nitrobenzoïque (DTNB) à 0.01 M.

Après 5 min d'incubation, la lecture de l'absorbance s'effectue à $\lambda = 412$. La concentration en glutathion (GSH) est évaluée selon la formule :

$$\text{GSH (nmol GSH/ mg protéine)} = \frac{\text{DO} \times 1 \times 1,525}{13100 \times 0.8 \times 0.5 \times \text{mg protéine}}$$

- DO : Densité optique ;
- 1 : Volume total des solutions utilisées dans la déprotéinisation ;
- 1.525 : Volume total des solutions utilisées dans le dosage du GSH au niveau du surnageant ;
- 13100 : Coefficient d'absorbance du groupement -SH à 412 nm ;
- 0.8 : Volume de l'homogénat ;
- 0.5 : Volume du surnageant.

La concentration de la forme réduite du glutathion (GSH) est mesurée par rapport à 1mg de protéines. Ce dosage doit donc être accompagné par le dosage des protéines.

5.3. Dosage des protéines

Le dosage des protéines a été effectué selon la méthode de Bradford (1976), qui utilise le Bleu Brillant de Coomassie et l'albumine de bœuf comme standard.

Le bleu de Coomassie réagit avec les groupements amines (-NH₂) des protéines pour former un complexe de couleur bleu. L'apparition de cette couleur reflète le degré

d'ionisation du milieu acide et l'intensité correspond à la concentration des protéines dans l'échantillon.

Pour cela, nous avons procédé aux étapes suivantes :

- ✓ Prélever 0.1 ml de l'homogénat.
- ✓ Ajouter 5 ml du bleu de Coomassie.
- ✓ Agiter et laisser reposer 5 minutes.
- ✓ Lire à 595 nm les densités optiques contre le blanc.

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 (BSA à 1 mg/ml), réalisée dans les mêmes conditions (fig.27)

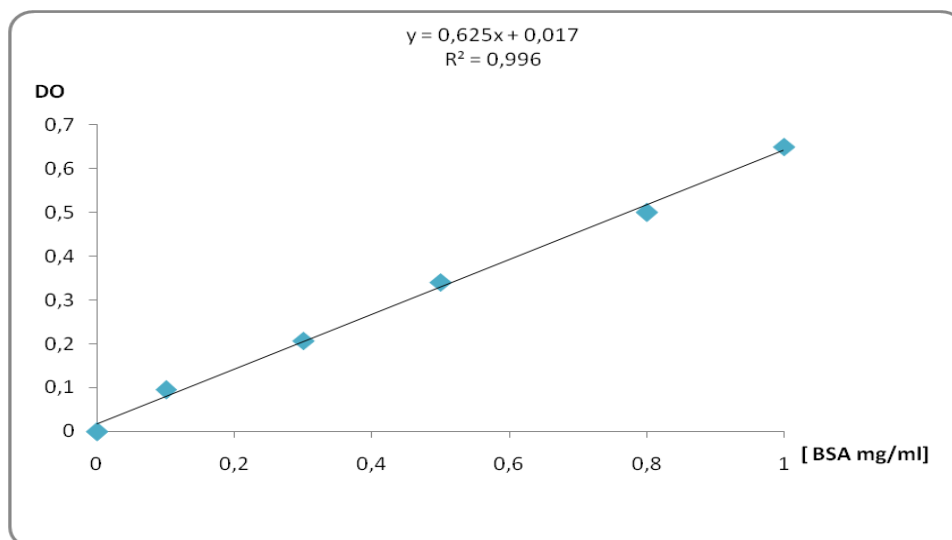


Figure 27 : la gamme d'étalonnage utilisée (BSA 1 mg/ml) pour le dosage des protéines.

5.4. Dosage de malondialdéhyde (MDA)

La peroxydation des lipides est estimée par mesure du malondialdéhyde (MDA) produit, capable de réagir avec l'acide thiobarbiturique (TBA). La réaction de dosage du malondialdéhyde, décrite par Esterbauer et al en 1992, repose sur la formation en milieu acide et à chaud entre le malondialdéhyde et deux molécules d'acide thiobarbiturique, d'un pigment absorbant à 530 nm.

La procédure s'est déroulée de la façon suivante :

- ✓ Prélever 375 µl de l'homogénat (surnageant).
- ✓ 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%).
- ✓ Vortexer et Centrifuger à 1000 tours/min pendant 10 min.
- ✓ 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 minutes.

La lecture se fait par spectrophotométrie, l'absorbance est directement proportionnelle à la quantité de MDA formé, donnant ainsi une évaluation précise des lipides peroxydés.

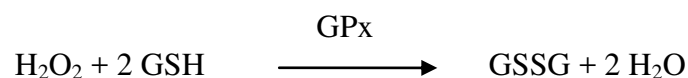
La concentration du MDA est calculée selon la loi de Beer-Lambert (DO = E.C.L) :

$$C \text{ (nmol/mg protéine)} = \frac{DO \cdot 10^6}{\varepsilon \cdot \chi \cdot L \cdot Fd}$$

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

5.5. Dosage de l'activité de la GPx

Le dosage de l'activité de la GPx tissulaire a été réalisé selon la méthode décrite par Flohe et Gunzler (1984), fondée sur l'oxydation du glutathion réduit (GSH) en glutathion oxydé (GSSG) par la GPx parallèlement à la réduction de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) en eau :



Ce dosage a été fait selon les étapes suivantes :

- ✓ Prélever 0.2 ml de l'homogénat (surnageant).
- ✓ Ajouter 0.4 ml de GSH (0.1 mM).
- ✓ Ajouter 0.2 ml de la solution tampon TBS (Tris 50 mM, NaCl 150 mM pH 7.4).
- ✓ Incuber au bain marie à 25 °C, pendant 5 min.
- ✓ Ajouter 0.2 ml de H₂O₂ (1.3 mM) pour initier la réaction, laisser agir pendant 10 minutes.
- ✓ Ajouter 1 ml de TCA (1%) pour arrêter la réaction.

Après incubation pendant 30 minutes dans la glace:

- ✓ 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), puis mélanger l'ensemble.

Après 5 minutes, l'activité de la GPx a ensuite été déterminée par spectrophotométrie à 412 nm selon la formule :

$$\text{GPx (nmol GSH/mg)} = \frac{\text{DO}_{\text{échantillon}} \times \text{DO}_{\text{étalon}} \times 0.04}{\text{DO}_{\text{étalon}}}$$

- DO_{échantillon} : Densité optique de l'échantillon ;
- DO_{étalon} : Densité optique de l'étalon ;
- 0.04 : Concentration de substrat (GSH).

6. Etude histologique

Les coupes histologiques ont été réalisées au laboratoire d'anatomie et cytologie pathologiques humaines (Niha, Annaba). La technique utilisée est celle décrite par (Houlot, 1984) qui comporte les étapes suivantes:

- ✓ **Fixation** : La fixation des échantillons à été faite dans le Bouin alcoolique. L'utilisation de ce fixateur a pour avantage de ramollir l'échantillon. Le liquide est préparé à partir :

- d'une solution acide picrique (75%)	45 ml.
- d'acide acétique (5%)	7 ml.
- de formaldéhyde	26 ml.
- d'eau distillée	22 ml.

✓ **Déshydratation**

Une fois fixées, les échantillons sont placés dans des bains successifs (48 heures) d'éthanol (70%, 80%, 90% et 100%), ils sont ainsi déshydratés par élimination d'eau dans les tissus. Cette opération permet également de stopper l'action du Bouin.

✓ **Inclusion à la paraffine**

Les prélèvements sont ensuite déposés dans des cassettes (boîtes en plastique avec une ouverture sur le dessus), qui sont plongées dans de la paraffine liquide à 56°C pour inclusion.

Les cassettes sont étiquetées pour permettre leurs identifications avant d'être mises au contact d'une plaque réfrigérée, la paraffine se solidifie alors en quelques secondes, on démoule la cassette pour obtenir un bloc solide près pour la coupe.

Des coupes de 3 à 5 µm sont réalisées sur un microtome (Microtome Reicher-Jung) à partir des blocs refroidis. Les coupes ainsi confectionnées sont étalées sur des lames porte-objet, puis dépliées et fixées par une eau gélatineuse chauffée à 40 °C. Elles sont ensuite conservées dans une étuve à 37 °C pendant 24 heures.

✓ **Coloration**

Après séchage, les lames sont colorées en HE (Hématoxyline-Eosine), coloration standard utilisée en histologie. Cette coloration a été effectuée selon le protocole suivant :

- Déparaffiner et hydrater les lames à l'eau de robinet puis rincer à l'eau distillé.
- Immerger dans un bain d'hématoxyline de Harris (15 min) qui colore en bleu violacée les structures basophiles (noyaux).

- Différencier les coupes dans l'alcool acide (100 ml éthanol à 70% + 50 ml HCl), puis les rincer à l'eau de robinet.
- Bleuir dans un bain d'eau ammoniacale (100 ml d'eau distillé + 2 ml d'ammoniaque).
- Immerger dans un bain d'Eosine (15 secondes à 2 min) qui colore les structures acidophiles (cytoplasme).
- Déshydratation rapide dans l'alcool et montage des lames en Eukitt. Tous ces bains sont séparés par des lavages à l'eau de robinet.

Après séchage, les lames peuvent être observées au microscope. Les photos des coupes ont été prises grâce à un microscope couplé à un appareil photo numérique.

7. Analyse statistique des résultats

Les moyennes \pm déviation standard (DS), avec un niveau significatif de $p \leq 0.05$, sont calculées pour chaque groupe d'expérience. Le test 't' de Student, l'analyse de la variance à un et deux critères de classification ont permis de mettre en évidence les différences entre les groupes étudiés au cours des tests effectués sur les paramètres physiologiques. Tous les calculs ont été effectués à l'aide du logiciel MINITAB d'analyse et de traitement des données version 15.0.

CHAPITRE II. RESULTATS ET DISCUSSION

II. RÉSULTATS ET DISCUSSION

1. Paramètres de croissance

1.1. Action sur la croissance corporelle

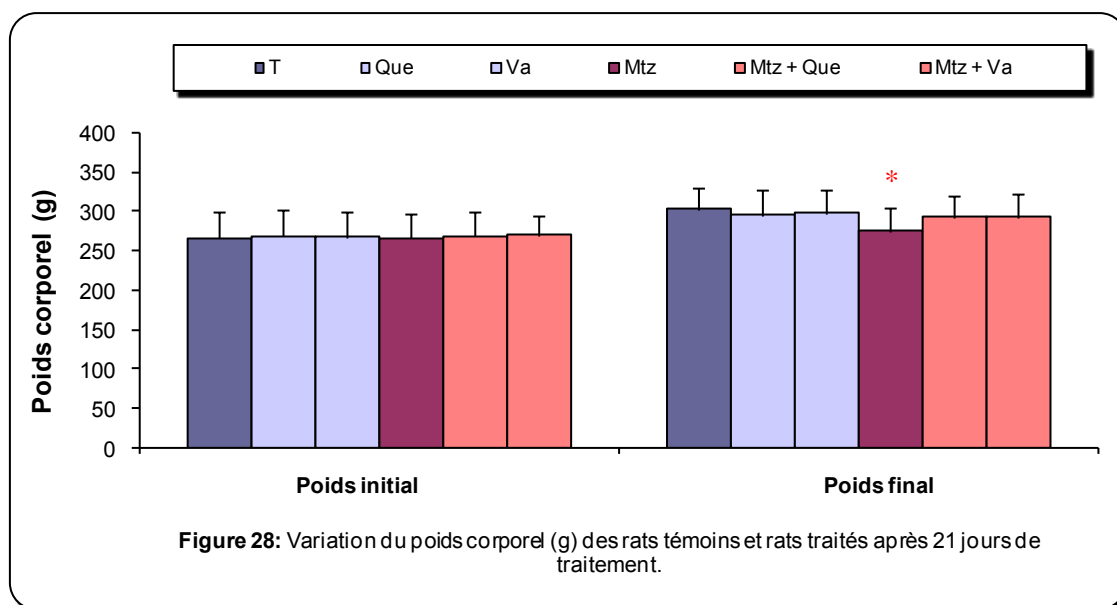
La variation du poids corporel moyen des rats témoins et traités est représentée dans le tableau 7 (chaque valeur correspond à la moyenne \pm E.S.M) et illustrée dans la figure 28. Le suivi de la masse des animaux durant toute la période de traitement, montre que l'utilisation de la métribuzine par voie orale induit un retard de la croissance corporelle ($p \leq 0.05$) des rats où une diminution de - 9,17 % du gain de poids corporel a été constaté au dernier jour de l'expérimentation. Cependant, aucune différence significative n'a été observée dans les lots traités avec la quercétine, la vanilline et la combinaison (Mtz + Que) et (Mtz + Va); comparant aux rats témoins. Le traitement à la quercétine ou à la vanilline chez les rats traités à la métribuzine atténuent la perte du poids corporel comparativement au groupe Mtz.

Tableau 7 : Variation du poids corporel PC (g) des rats témoins et rats traités après 21 jours de traitement.

<i>Paramètres</i>	Lots expérimentaux					
	<i>Témoin</i>	<i>Que</i>	<i>Va</i>	<i>Mtz</i>	<i>Mtz + Que</i>	<i>Mtz + Va</i>
<i>Poids initial (g)</i>	266.62 \pm 33.36	269.5 \pm 33.64	267.75 \pm 31.67	266.37 \pm 31.07	269.62 \pm 30.46	270.88 \pm 25.56
<i>Poids final (g)</i>	303.75 \pm 27.14	296.13 \pm 31.04	298.38 \pm 28.72	275.88 \pm 30.55 *	292.88 \pm 28.23	293.63 \pm 29.07
<i>%</i>	-	- 2.51%	- 1.77%	- 9.17%	- 3.58%	- 3.33%
<i>Gain de poids (g)</i>	+ 37.13	+ 26.63	+ 30.63	+ 9.26	+ 23.26	+ 22.75

*: Différence significative comparant au témoin ($p \leq 0,05$).

p : Seuil de signification.



(*) : Différence significative comparant au témoin ($p \leq 0,05$).

1.2. Action sur les poids relatif et absolu de certains organes

1.2.1. Foie

Au terme de 21 jours de traitement, une augmentation notable des poids relatif ($p \leq 0.0003$) et absolu ($p \leq 0.005$) du foie a été observée chez les rats mâles après exposition par voie orale à 133,33 mg/kg/j de métribuzine. Cette augmentation a été plus faible lors de combinaison de la quercétine (PR, $p \leq 0.006$; PA, $p \leq 0.02$) à la dose 50 mg/kg ou la vanilline (PR, $p \leq 0.002$) à la dose 150 mg/kg ; comparant au lot témoin. La supplémentation de la quercétine ou la vanilline chez les rats traités à la Mtz diminue significativement les poids absolu ($p \leq 0,05$ et $p \leq 0,03$, respectivement) et relatif ($p \leq 0.002$) ; comparativement à ceux recevant la métribuzine seulement (tab.8 ; fig.29).

1.2.2. Reins

Comparativement au lot témoin, une augmentation absolue ($p \leq 0.008$) et relative ($p \leq 0.0001$) statistiquement significative du poids des reins a été observée chez les rats exposés au métribuzine. D'autre part, l'addition de la quercétine (PA, $p \leq 0.05$; PR, $p \leq 0.002$) ou la vanilline (PR, $p \leq 0.005$) à la métribuzine a diminué l'effet toxique comparativement aux rats témoins. La vanilline administré chez les rats du groupe (Mtz + Va) diminue significativement les poids absolu et relatif des reins ($p \leq 0,001$ et $p \leq 0,0003$, respectivement) par rapport aux animaux du groupe Mtz. De même, les rats du groupe (Mtz + Que) ont montré

une diminution des poids absolu et relatif ($p \leq 0.0002$) des reins par rapport aux rats appartenant au groupe Mtz (tab.8 ; fig.30).

Tableau 8 : Variation du poids absolu PA (g) et du poids relatif PR (g/100g de poids corporel) des organes (foie, reins, cerveau et testicules) chez les rats témoins et rats traités après 21 jours de traitement.

<i>Paramètres</i>	Lots expérimentaux					
	Témoin	Que	Va	Mtz	Mtz + Que	Mtz + Va
<i>PA du foie</i>	<i>9.09 ± 0.60</i>	<i>8.64 ± 0.63</i>	<i>8.57 ± 1.02</i>	<i>10.60 ± 0.72 **</i>	<i>9.78 ± 0.39 *##</i>	<i>9.70 ± 0.51 #</i>
<i>PR du foie</i>	<i>3.00 ± 0.12</i>	<i>2.93 ± 0.14</i>	<i>2.87 ± 0.14</i>	<i>3.76 ± 0.32 ***</i>	<i>3.36 ± 0.26 **##</i>	<i>3.32 ± 0.21 **##</i>
%	-	- 2,33 %	- 4,33 %	+ 25,33 %	+ 12 %	+ 10,67 %
<i>PA des reins</i>	<i>1.50 ± 0.18</i>	<i>1.54 ± 0.07</i>	<i>1.52 ± 0.07</i>	<i>1.83 ± 0.10 **</i>	<i>1.67 ± 0.09 *</i>	<i>1.63 ± 0.09 ###</i>
<i>PR des reins</i>	<i>0.49 ± 0.03</i>	<i>0.52 ± 0.03</i>	<i>0.51 ± 0.03</i>	<i>0.67 ± 0.04 ***</i>	<i>0.57 ± 0.03 **###</i>	<i>0.56 ± 0.03 **###</i>
%	-	+ 6,12 %	+ 4,08 %	+ 36,73 %	+ 16,33 %	+ 14,28 %
<i>PA du cerveau</i>	<i>1.23 ± 0.08</i>	<i>1.20 ± 0.06</i>	<i>1.22 ± 0.09</i>	<i>1.26 ± 0.13</i>	<i>1.22 ± 0.05</i>	<i>1.21 ± 0.04</i>
<i>PR du cerveau</i>	<i>0.41 ± 0.05</i>	<i>0.41 ± 0.03</i>	<i>0.41 ± 0.02</i>	<i>0.46 ± 0.08 *</i>	<i>0.42 ± 0.03</i>	<i>0.41 ± 0.03</i>
%	-	0 %	0 %	+ 12,19 %	+ 2,44 %	0 %
<i>PA des testicules</i>	<i>3.22 ± 0.26</i>	<i>3.02 ± 0.34</i>	<i>3.20 ± 0.49</i>	<i>3.28 ± 0.36</i>	<i>3.13 ± 0.31</i>	<i>3.07 ± 0.15</i>
<i>PR des testicules</i>	<i>1.06 ± 0.08</i>	<i>1.03 ± 0.12</i>	<i>1.07 ± 0.09</i>	<i>1.16 ± 0.11 *</i>	<i>1.07 ± 0.06</i>	<i>1.03 ± 0.10</i>
%	-	- 2,83 %	+ 0,94 %	+ 9,43 %	+ 0,94 %	- 2,83 %

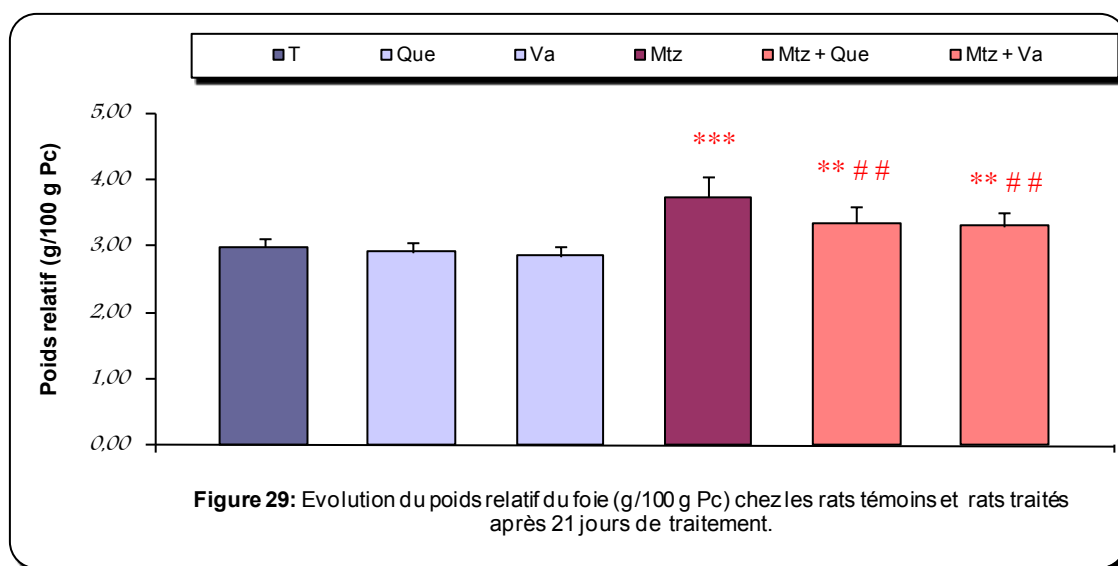
Différence significative : tous les groupes traités par rapport au témoin (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$). Les groupes (Mtz + Que) et (Mtz + Va) par rapport au groupe métribuzine (# $p \leq 0,05$, ## $p \leq 0,01$, ### $p \leq 0,001$).

1.2.3. Cerveau

L'étude statistique de la variation des poids des organes par rapport à 100 g du poids corporel a montré qu'il y a une différence significative (PR, $p \leq 0.05$) du rapport cerveau-corporel des rats traités par la métribuzine comparant aux témoins. Toutefois, aucune variation significative de la masse absolue et relative moyenne cérébrale n'a été observée chez les groupes traités par la combinaison (Mtz + Que) et (Mtz + Va) par rapport au groupe témoin et métribuzine (tab.8 ; fig.31).

1.2.4. Testicules

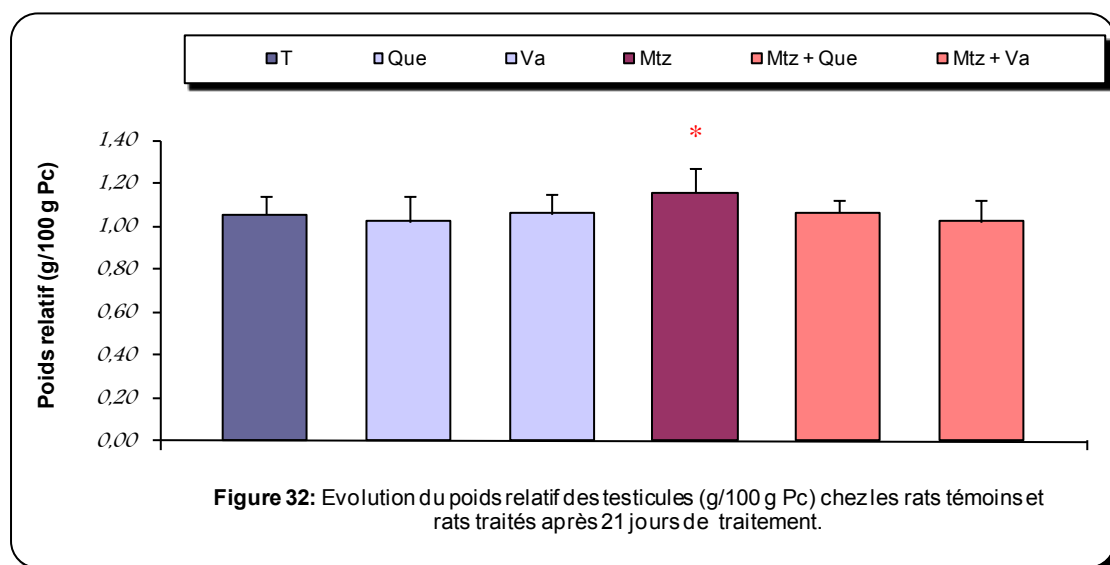
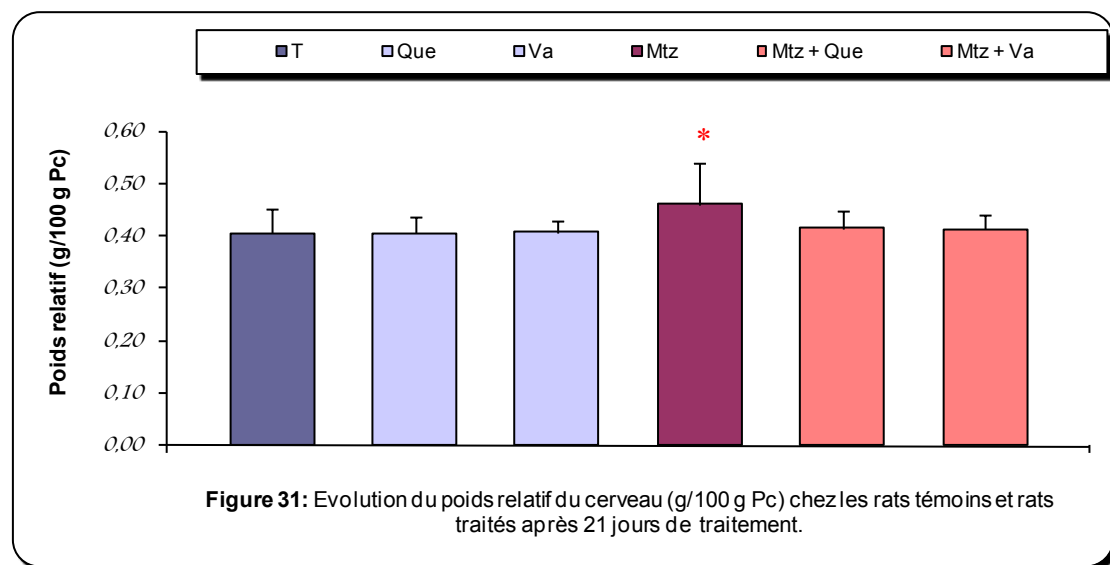
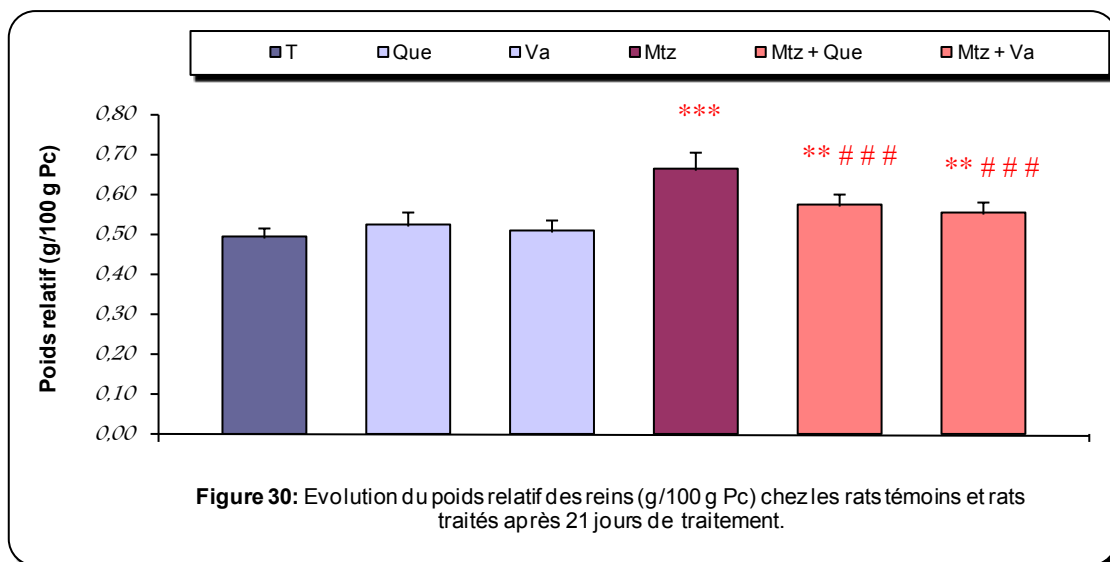
La métribuzine a provoqué également une augmentation significative ($p \leq 0.03$) du poids relatif des testicules comparant au groupe témoin. Par contre, une diminution du poids relatif de cet organe a été observée chez les groupes traités par la combinaison (Mtz + Que) et (Mtz + Va) ; sans aucune différence significative comparant aux groupes témoins et traités à la métribuzine (tab.8 ; fig.32).



(**): Différence hautement significative comparant au témoin ($p \leq 0,01$).

(***): Différence très hautement significative comparant au témoin ($p \leq 0,001$).

(##): Différence hautement significative comparant au groupe métribuzine ($p \leq 0,01$).



Dans le cadre de ce travail de thèse, il est apparu important de disposer d'une approche multidimensionnelle en ayant recours à des biomarqueurs associés à différents aspects de l'action toxique possible de métribuzine. Comme évoqué dans les chapitres précédents, nous avons donc choisi de focaliser nos efforts sur trois principaux axes de recherche : étude du stress oxydant, de la toxicité des pesticides et de la possibilité d'amélioration des effets toxiques attendus de métribuzine.

Les biomarqueurs retenus pour notre étude sont en effet susceptibles de répondre à une contamination par la métribuzine à une dose de 133,33 mg/kg (1/20 de LD50), et leurs modulations sont le reflet d'altérations de molécules et de systèmes cellulaires impliqués dans des grandes fonctions de la cellule.

Parmi les biomarqueurs étudiés, les paramètres de croissance présentent des variations qui semblent être liées à l'exposition des rats à la métribuzine. Nous observons, en effet, une réduction significative du poids corporel avec une augmentation du poids relatif des organes (foie, reins, cerveau et testicules) des rats. Un effet similaire sur le poids corporel a également été observé chez des rats (Chiali et al., 2013) et des poissons (Plhalova et al., 2012) traités avec de différentes doses de métribuzine.

Ainsi, un déficit de croissance a été constaté chez des rats exposés à d'autres pesticides ; à la cyperméthrine (Mossa et al., 2015) ou au Roundup (Pandey et Rudraiah, 2015). Ce type d'impact a également été mis en évidence chez le poisson zèbre *Danio rerio*, exposé à des concentrations sublétales d'atrazine (Plhalova et al., 2012).

Au travers des différentes études (Maksymiv et al., 2015 ; Chiali et al., 2013 ; Medjdoub et al., 2011) menées dans le but d'évaluer la toxicité de la métribuzine, nous avons pu voir que la métribuzine est effectivement un élément prooxydant. Il est donc capable de déclencher chez le rat un stress oxydatif. De ce fait, la perte de poids observée dans notre étude peut résulter de l'effet du stress sur la croissance. En effet, le stress oxydant influe sur la croissance essentiellement via la modification du métabolisme énergétique (Gregory et Wood, 2010). Cette modification du métabolisme, est souvent interprétée comme un moyen de mobiliser les ressources énergétiques pour lutter face au stress causé par le xénobiotique (Jyothi et Narayan, 1999 ; Verma et al., 1983). En perturbant les allocations d'énergie chez les individus exposés, ce stress est susceptible d'abaisser la croissance des rats.

D'autre part, l'exposition au métribuzine est associée à une augmentation du poids de certains organes, particulièrement le foie et les reins, en raison de leurs rôles dans le processus de détoxification (métabolisme et excrétion) des xénobiotiques. Dans notre organisme le foie et les reins sont les principaux organes en charge d'assurer la détoxification, et leurs activités s'adaptent à la quantité de xénobiotiques qui leur est amenée (Osuala et al., 2014). L'ingestion de pesticides peut s'accompagner d'une demande accrue de métabolisme et d'excrétion, qui s'est traduit par une augmentation de la masse relative du foie et des reins de l'animal (Sharma et al., 2014).

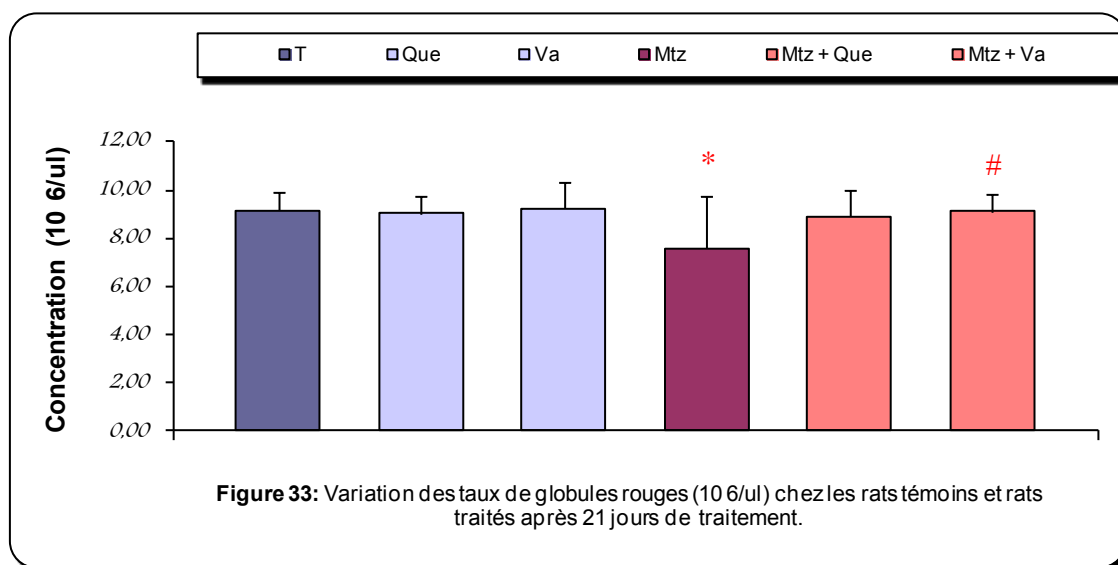
Par ailleurs, les polyphénols (quercétine et vanilline) de part ces propriétés antioxydantes auraient contribué à l'élévation de poids corporel et à la diminution des poids relatifs des organes chez les rats traités à la métribuzine.

un nombre significatif d'étude (Abdel Rasoul et Marei, 2016 ; Mossa et al., 2015 ; Ojo et al., 2014 ; Dutta et Sahu, 2013) montrent également une présence d'effet bénéfique des polyphénols sur le poids corporel, la masse relative du foie et des reins ou encore des testicules et du cerveau ; des rats traités avec des pesticides.

L'ensemble de ces résultats montre que la quercétine et la vanilline semblent protéger le foie, les reins, le cerveau ainsi que les testicules de l'accumulation de la métribuzine ; et confirme le potentiel des polyphénols pour une action protectrice contre la toxicité de pesticides.

2. Effets sur la fonction hématologique

Les résultats présentés dans le tableau 9 ont montré au niveau de l'hémogramme que la métribuzine associée à de la quercétine (Mtz + Que) ou la vanilline (Mtz + Va) a été sans effet significatif sur les éléments figurés du sang dans leur majorité. Cependant, la métribuzine administrée seule chez les rats abaisse significativement le nombre de globules rouges ($p \leq 0,05$; fig.33) et d'hématocrite ($p < 0,01$; fig.34) comparativement aux rats témoins. Dans le même sens, l'hémoglobine (Hb) diminue significativement chez les rats traités par la Mtz ($p \leq 0,04$; fig.35) par rapport aux témoins.



(*) : Différence significative comparant au témoin ($p \leq 0,05$).

(#) : Différence significative comparant au groupe métribuzine ($p \leq 0,05$).

Toutefois, l'administration de la vanilline chez les rats traités à la Mtz a montré une élévation statistiquement significative du taux des globules rouges ($p \leq 0,02$), d'hémoglobine ($p \leq 0,05$) et de l'hématocrite ($p \leq 0,04$) par rapport aux rats du groupe Mtz. L'association de métribuzine avec la quercétine a également montré une stabilité relative de ces paramètres mais les analyses statistiques montrent qu'il n'y a pas eu de variations statistiquement significative chez le groupe (Mtz + Que) comparativement au groupe Mtz (tab.9).

En outre, nous avons signalé une diminution significative ($p \leq 0,05$; fig.36) du volume globulaire moyen (VGM) chez les rats traités à la métribuzine par rapport aux témoins. La quercétine ou la vanilline injectée aux animaux traités à la Mtz ont induit un accroissement

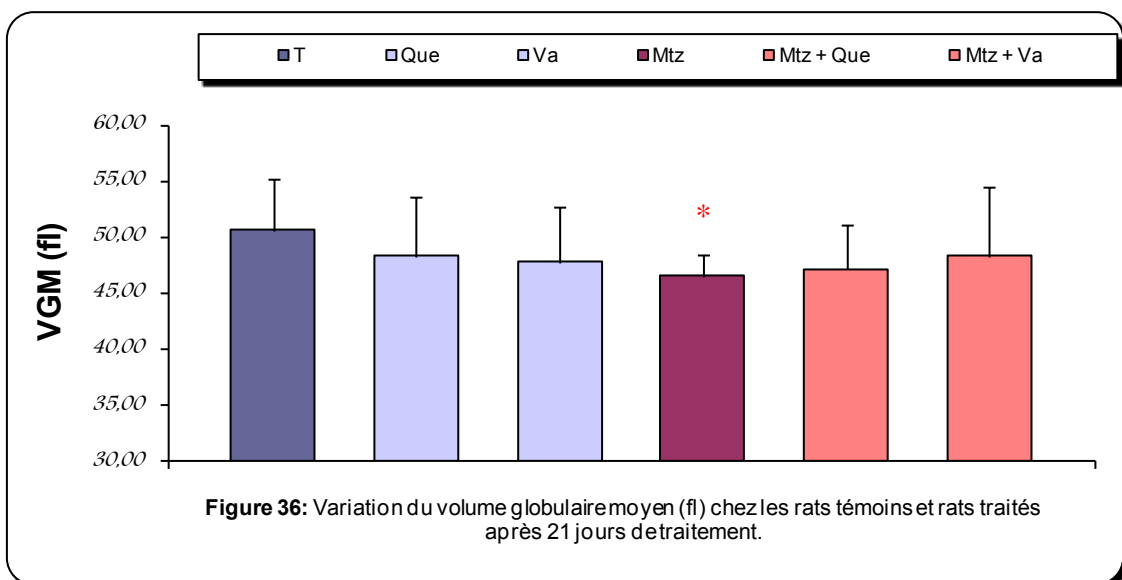
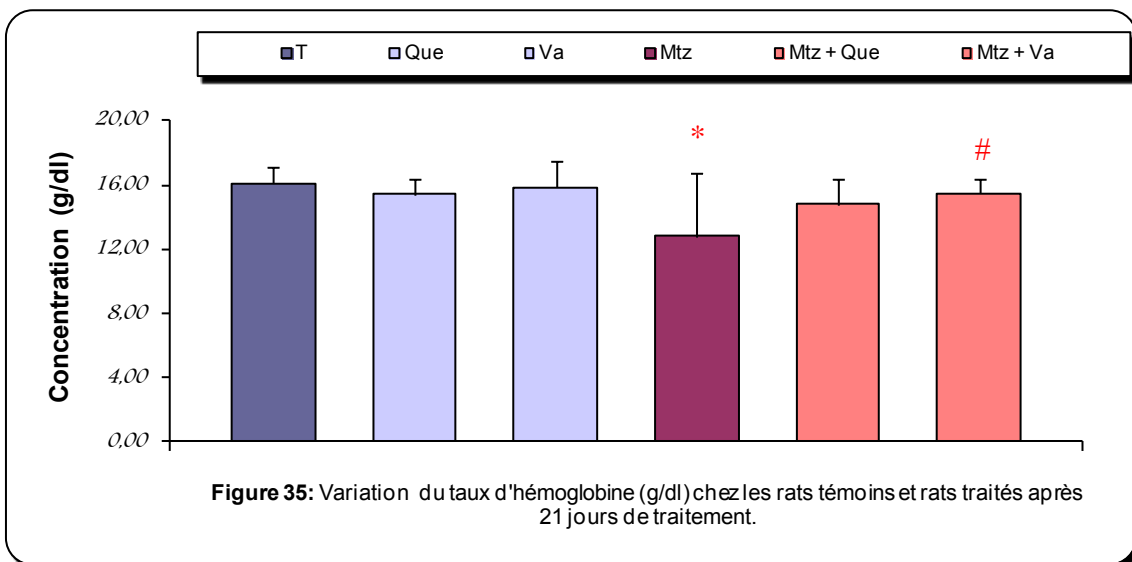
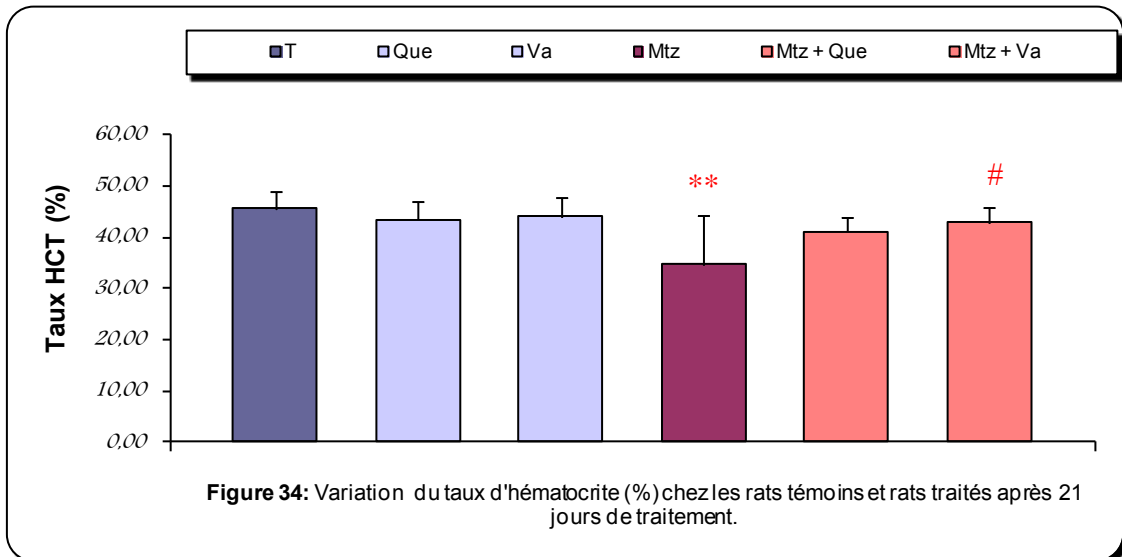
non significatif du volume globulaire moyen comparativement aux rats témoins et traités à la métribuzine (tab.9).

Tableau 9 : Variation de quelques paramètres hématologiques chez les rats témoins et rats traités après 21 jours de traitement.

<i>Paramètres</i>	Lots expérimentaux					
	<i>Témoin</i>	<i>Que</i>	<i>Va</i>	<i>Mtz</i>	<i>Mtz + Que</i>	<i>Mtz + Va</i>
<i>Globules rouges ($\times 10^6 / \mu l$)</i>	<i>9.15 ± 0.75</i>	<i>9.06 ± 0.74</i>	<i>9.25 ± 1.13</i>	<i>7.58 ± 2.16*</i>	<i>8.91 ± 1.12</i>	<i>9.13 ± 0.75#</i>
%	-	- 0.98 %	+ 1.09 %	- 17.16 %	- 2.62 %	- 0.22 %
<i>Taux d'hémoglobine (g/dl)</i>	<i>16.14 ± 1.00</i>	<i>15.44 ± 0.96</i>	<i>15.86 ± 1.65</i>	<i>12.85 ± 3.95*</i>	<i>14.81 ± 1.55</i>	<i>15.48 ± 0.98#</i>
%	-	- 4.34 %	- 1.73 %	- 20.38 %	- 8.24 %	- 4.09 %
<i>Taux d'hématocrites (%)</i>	<i>45.77 ± 3.42</i>	<i>43.51 ± 3.61</i>	<i>44.14 ± 3.94</i>	<i>34.82 ± 9.65**</i>	<i>41.15 ± 3.01*</i>	<i>42.91 ± 3.20#</i>
%	-	- 4.94 %	- 3.56 %	- 23.92 %	- 10.09 %	- 6.25 %
<i>VGM (fl)</i>	<i>50.62 ± 4.56</i>	<i>48.25 ± 5.28</i>	<i>47.75 ± 4.89</i>	<i>46.5 ± 1.93*</i>	<i>47.12 ± 3.98</i>	<i>48.25 ± 6.18</i>
<i>TGMH (g/dl)</i>	<i>17.81 ± 1.11</i>	<i>16.96 ± 1.03</i>	<i>17.20 ± 0.95</i>	<i>16.85 ± 0.96</i>	<i>16.92 ± 1.06</i>	<i>17.38 ± 1.30</i>
<i>CCMH (pg)</i>	<i>35.31 ± 1.75</i>	<i>35.66 ± 2.00</i>	<i>35.96 ± 2.55</i>	<i>36.2 ± 2.60</i>	<i>36.05 ± 2.07</i>	<i>35.66 ± 2.71</i>

Différence significative : tous les groupes traités par rapport au témoin (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$).

Les groupes (Mtz + Que) et (Mtz + Va) par rapport au groupe métribuzine (# $p \leq 0,05$).



En plus d'affecter la croissance pondérale des rats, les pesticides ont également des effets non négligeables sur le système hématologique. En effet, de nombreuses études (Hashish et Elgaml, 2016 ; Mehra et al., 2014 ; Lalruatfela et al., 2014 ; Demur et al., 2013) ont montré un lien entre l'exposition aux pesticides et les troubles hématologiques.

Le système hématologique peut être considéré comme conducteur pour les substances qui pénètrent dans le corps et comme organe pouvant être affecté par des expositions à des agents potentiellement nocifs. Les prélèvements sanguins peuvent servir de contrôle biologique de l'exposition et fournir le moyen d'évaluer les effets d'un toxique sur le système hématopoïétique et les autres organes. Les agents présents dans l'environnement peuvent interférer de plusieurs manières avec le système hématopoïétique: en inhibant la synthèse d'hémoglobine, ainsi que la production ou la fonction cellulaire, et en accélérant la destruction des hématies (Dufresne, 2000).

Cette étude met en évidence des effets de la métribuzine pesticide sur le compartiment sanguin. À la lumière des résultats obtenus, une diminution du compte érythrocytaire, du taux d'hématocrite ainsi que de la charge en hémoglobine a été observée chez les rats qui ont été exposés seulement à la métribuzine. Ces observations sont donc compatibles avec les résultats des études précédentes et corroborent ces conclusions. De même, des altérations des cellules sanguines ont été mises en évidence chez la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) exposée au métribuzine (Velisek et al., 2008).

Sur la base de ces observations, les auteurs ont suggéré que la baisse des éléments du sang pourrait être attribuable à une anémie hémolytique (lyse cellulaire) causée par la capacité du pesticide d'agir directement sur les érythrocytes en provoquant une hémolyse extravasculaire massive ou d'induire un stress oxydatif (Hashish et Elgaml, 2016 ; Lalruatfela et al., 2014 ; Demur et al., 2013).

Bien que dépourvues de mitochondrie, les hématies ou érythrocytes sont particulièrement sensibles aux radicaux libres de l'oxygène (Demur et al., 2013 ; Brun et al., 1998). Le stress oxydant peut altérer la membrane des érythrocytes en s'attaquant aux lipides membranaires, rendant par la même les membranes cellulaires plus fragiles et provoquant ainsi une lyse des érythrocytes (Hashish et Elgaml, 2016 ; Lalruatfela et al., 2014).

De plus, la diminution de l'hématocrite et du taux d'hémoglobine sanguins observée chez les rats du groupe Mtz serait probablement liée à la destruction excessive d'érythrocytes (Hashish et Elgaml, 2016).

Cependant, l'anémie provoqué par la métribuzine est corrigée chez le groupe traité par la combinaison (métribuzine/ quercétine) après 21 jours de traitement. Cette observation est en accord avec d'autres études qui affirment que la quercétine protège les érythrocytes contre l'hémolyse induite par les radicaux libres (Mladenović et al., 2014 ; Baş et al., 2014 ; Henneberg et al., 2013 ; Ashar Waheed et Muthu Mohammed, 2012).

En outre, on a aussi observé cette réversibilité de l'anémie induite par la métribuzine chez le groupe traité par la combinaison (métribuzine/ vanilline). Au vu des ces résultats, la supplémentation en quercétine ou vanilline semble diminuer le risque de la toxicité hématologique. La structure phénolique de ces composés, pourrait expliquer la résistance des globules rouges des rats traités à la métribuzine.

À cet égard, les résultats sont conformes à ceux obtenus par Dutta et al (2014) à l'aide d'extraits de *Pterocarpus santalinus* et de ses constituants actifs (flavonoïdes, alcaloïdes, saponines et triterpénoïde), qui ont donné une protection des hématies contre la toxicité induite par l'insecticide coragen.

De même, grâce à la présence de polyphénols flavonoïdes l'administration de l'extrait de thé vert par gavage à une dose de 36 mg/kg/j a augmenté de façon significative le taux d'hémoglobine et le nombre de globules rouges des rats traités par l'insecticide malathion après quatre semaines de traitement (Elzoghby et al., 2014).

3. Etude des paramètres biochimiques

Les résultats illustrés dans le tableau 10 et qui concernent le dosage des paramètres biochimiques affirment l'existence d'une grande perturbation métabolique :

3.1. Glucose

D'après les résultats obtenus on constate une augmentation significative ($p \leq 0,02$) de la concentration plasmatique en glucose chez le groupe traité par la métribuzine (+ 6,76 %), on n'a toutefois noté aucune différence significative chez les groupes (Mtz + Que) et (Mtz + Va) en comparaison avec le groupe témoin. Le traitement à la quercétine (Mtz + Que) ou la vanilline (Mtz + Va) a abouti à une diminution significative du glucose ($p \leq 0,02$, $p \leq 0,01$ respectivement) comparativement aux rats du groupe Mtz (tab.10 ; fig.37).

3.2. Bilirubine totale

Le traitement des rats par la métribuzine pendant 21 jours, entraîne une augmentation hautement significative ($p \leq 0,003$) de la concentration plasmatique en bilirubine totale (+ 41,96 %) par rapport aux témoins. L'augmentation est significative ($p \leq 0,05$) aussi bien chez les animaux du groupe (Mtz + Que). En revanche, chez les rats traités par la combinaison (Mtz + Va) on enregistre aucune différence significative comparant aux rats témoins.

Par ailleurs, l'association de métribuzine avec la quercétine ou la vanilline a rétabli de manière significative ($p \leq 0,002$ et $p \leq 0,01$, respectivement) le taux moyen de la bilirubine comparativement à celui enregistré chez les rats du groupe Mtz (tab.10 ; fig.38).

3.3. Urée

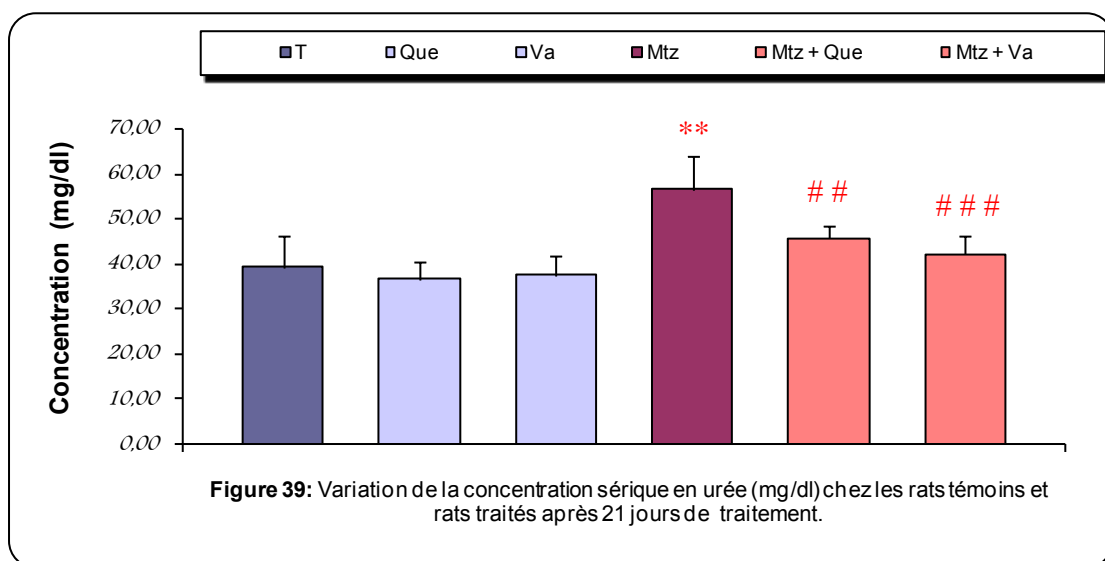
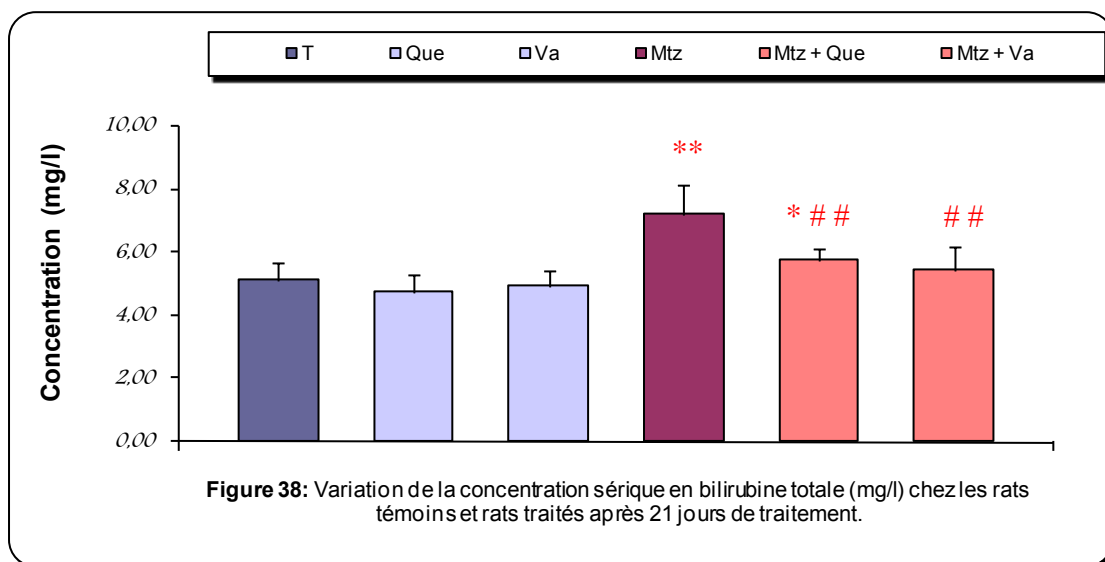
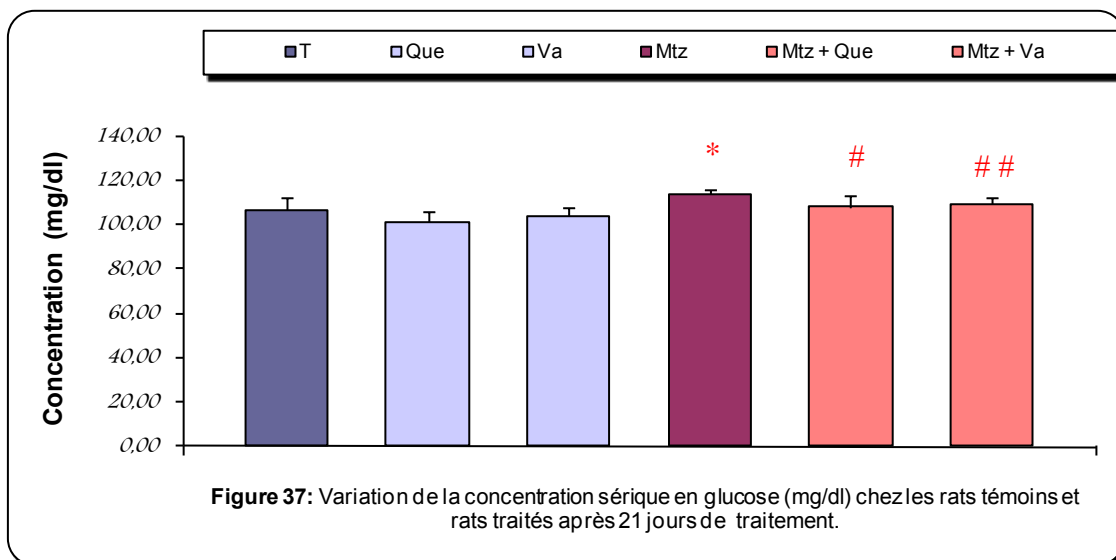
L'analyse statistique révèle qu'il existe une augmentation significative ($p \leq 0,005$) du taux sérique en urée (+ 43,34%) chez les rats traités par la métribuzine par rapport aux rats témoins. Avec l'association au Que ou Va, la dose toxique de Mtz (133.33 mg/kg) n'a pas influencé la concentration de l'urée qui n'a pas significativement changé comparativement au témoin.

Chez les groupes (Mtz + Que) et (Mtz + Va) dont les rats ont été supplémentés respectivement en quercétine et vanilline, une amélioration du taux sérique en urée a été signalée chez les rats ($p \leq 0,01$ et $p \leq 0,001$, respectivement) comparativement aux rats du groupe Mtz (tab.10; fig.39).

Tableau 10 : Variation de quelques paramètres biochimiques chez les rats témoins et rats traités après 21 jours de traitement.

Paramètres	Lots expérimentaux					
	Témoin	Que	Va	Mtz	Mtz + Que	Mtz + Va
Glucose (mg/dl)	107.25 ± 6.09	101.87 ± 4.29	104.63 ± 4.14	114.5 ± 2.20*	108.5 ± 5.10#	109.88 ± 2.90##
%	-	- 5,02 %	- 0,02 %	+ 6,76 %	+ 1,16 %	+ 2,45 %
Bilirubine totale (mg/l)	5.10 ± 0.60	4.76 ± 0.58	4.92 ± 0.42	7.24 ± 0.91**	5.73 ± 0.42*.,##	5.43 ± 0.79##
%	-	- 6,67 %	- 3,53 %	+ 41,96 %	+ 12,35 %	+ 6,47 %
Urée (mg/dl)	39.5 ± 6.70	36.62 ± 3.78	37.63 ± 4.24	56.62 ± 7.59**	45.87 ± 2.64##	42.38 ± 4.07###
%	-	- 7,29 %	- 4,73 %	+ 43,34 %	+ 16,13 %	+ 7,29 %
Créatinine (mg/l)	0.49 ± 0.08	0.42 ± 0.06	0.44 ± 0.12	0.85 ± 0.10***	0.57 ± 0.08*.,###	0.52 ± 0.11###
%	-	- 14,28 %	- 10,20 %	+ 73,47 %	+ 16,33 %	+ 6,12 %
Cholestérol (g/l)	0.96 ± 0.13	0.85 ± 0.07	0.94 ± 0.12	1.24 ± 0.18**	1.06 ± 0.12#	1.10 ± 0.11*.,#
%	-	- 11,46 %	- 2,08 %	+ 29,17 %	+ 10,42 %	+ 14,58 %
Triglycérides (g/l)	0.95 ± 0.08	0.93 ± 0.14	0.91 ± 0.13	1.12 ± 0.09**	1.03 ± 0.06#	0.98 ± 0.13#
%	-	- 2,10 %	- 4,21 %	+ 17,89 %	+ 8,42	+ 3,15 %
Protéine totale (g/l)	71.75 ± 4.12	71.73 ± 4.34	72.23 ± 3.36	65.27 ± 5.41*	69.84 ± 3.08#	70.07 ± 3.44#
%	-	- 0,03 %	+ 0,67 %	- 9,03 %	- 2,66 %	- 2,34 %
AST (U/L)	79.62 ± 5.83	83.37 ± 5.95	82.12 ± 7.94	90.87 ± 4.85**	84.37 ± 5.88*.,#	83.00 ± 5.29
%	-	+ 4,71 %	+ 3,14 %	+ 14,13 %	+ 5,96 %	+ 4,24 %
ALT (U/L)	31.37 ± 4.93	34.75 ± 4.77	34.62 ± 4.66	44.12 ± 7.64**	36.87 ± 5.25###	38.00 ± 4.75*.,#
%	-	+ 10,77 %	+ 10,36 %	+ 40,64 %	+ 17,53 %	+ 21,13 %
PAL (U/L)	145.12 ± 9.33	142.25 ± 7.92	146.75 ± 11.11	224.62 ± 49.14**	156.75 ± 6.88*.,##	160.25 ± 6.71*.,##
%	-	- 1,98 %	+ 1,12 %	+ 54,78 %	+ 8,01 %	+ 10,42 %

Différence significative : tous les groupes traités par rapport au témoin (* p ≤ 0,05, ** p ≤ 0,01, *** p ≤ 0,001). Les groupes (Mtz + Que) et (Mtz + Va) par rapport au groupe métribuzine (# p ≤ 0,05, ## p ≤ 0,01, ### p ≤ 0,001).



3.4. Créatinine

Dans le groupe Mtz, nous avons enregistré une augmentation très hautement significative ($p \leq 0.0002$) du taux de la créatinine (73,47 %) chez les rats mâles par rapport à leurs témoins. Cependant, une augmentation significative ($p \leq 0.04$) a été enregistrée chez les rats traités à la (Mtz + Que) et aucune différence significative n'a été observée chez les rats (Mtz + Va) comparant aux témoins.

Bien que ces mesures révèlent des changements significatifs particulièrement chez les rats (Mtz), le traitement à la quercétine ou la vanilline chez ces animaux a significativement diminué le taux de créatinine ($p \leq 0.001$) dans les groupes (Mtz + Que) et (Mtz + Va) par rapport au groupe Mtz (tab.10 ; fig.40).

3.5. Cholestérol total

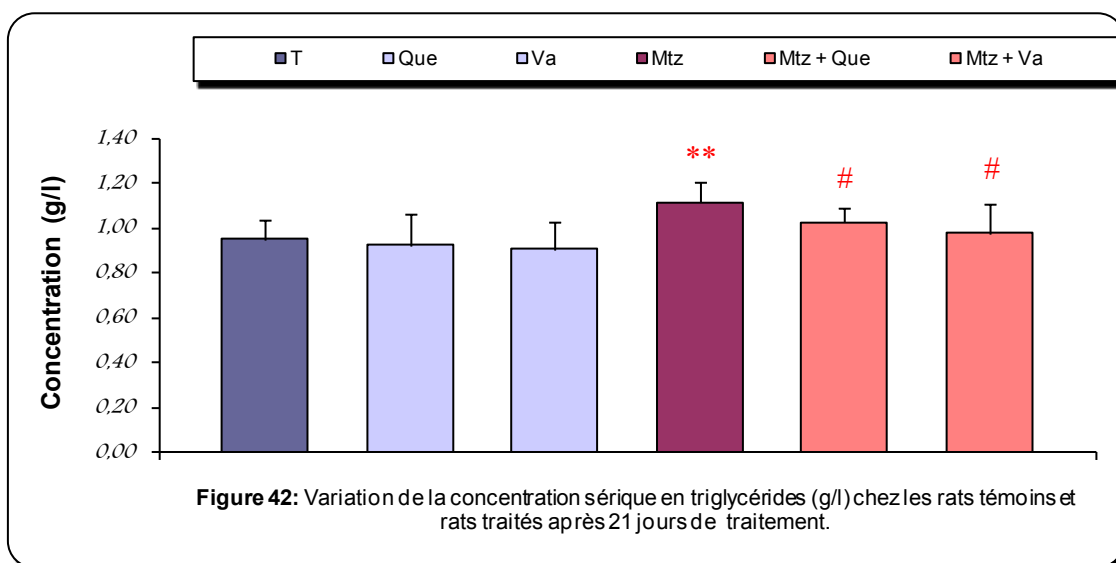
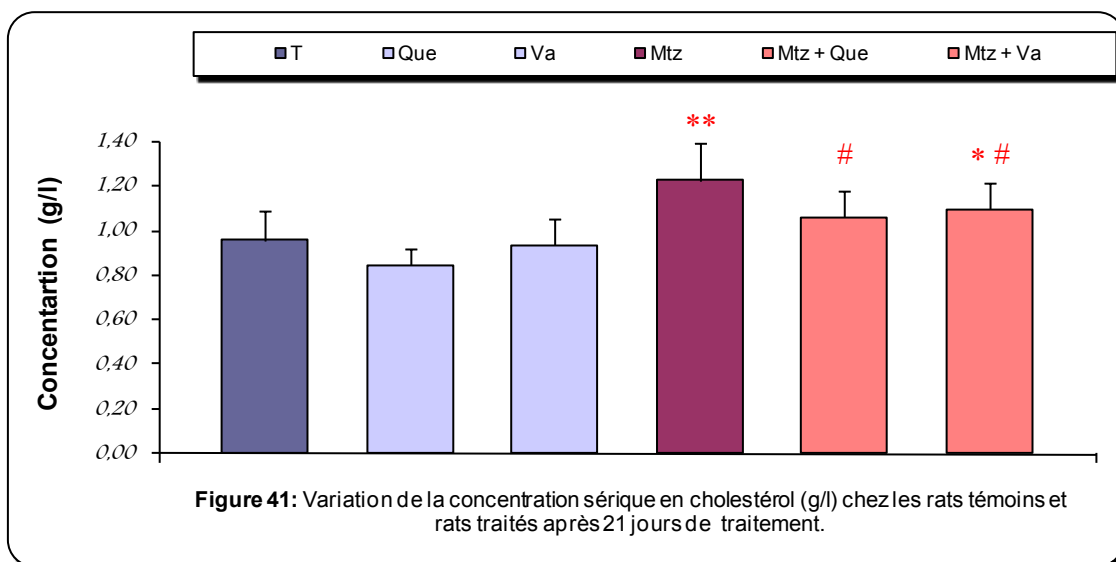
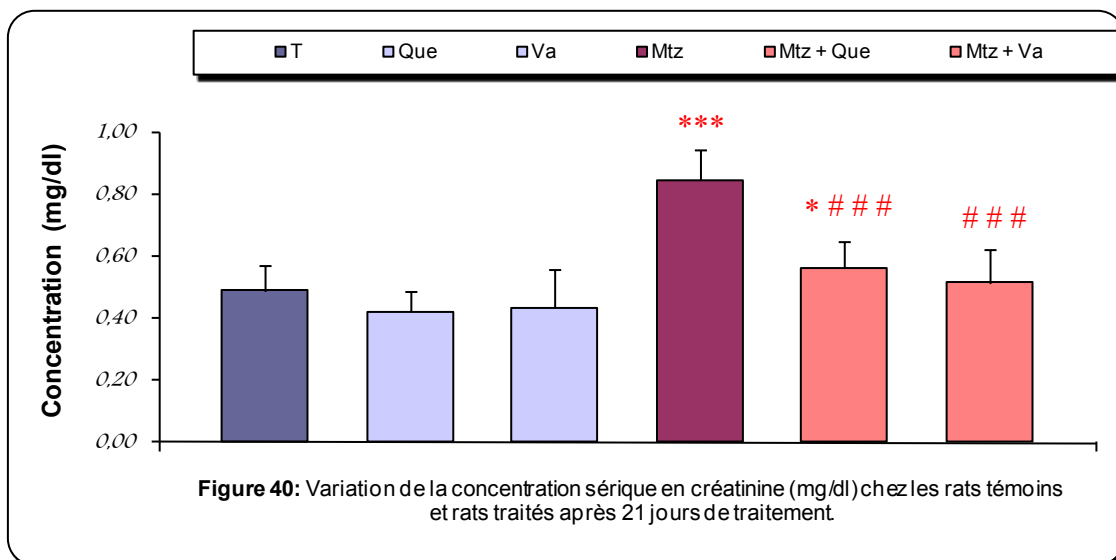
Nos résultats montrent une augmentation hautement significative ($p \leq 0.004$) du taux sérique du cholestérol (+ 29,17 %) chez les rats traités par la métribuzine par rapport aux rats témoins. On note aussi une augmentation significative ($p \leq 0.04$) de la concentration sérique en cholestérol chez les rats traités par la métribuzine/vanilline (+ 14,58 %) et aucune différence significative chez les rats traités par la métribuzine/quercétine par rapport toujours aux rats témoins.

Néanmoins, l'injection de la quercétine ou la vanilline aux rats traités à la métribuzine a induit une réduction du taux de cholestérol plasmatique ($p \leq 0.02$ et $p \leq 0.04$, respectivement) par rapport aux rats ayant uniquement reçu de Mtz (tab.10 ; fig.41).

3.6. Triglycérides

La concentration des triglycérides sériques s'élève significativement ($p \leq 0.004$) chez les rats du groupe (Mtz) par rapport au groupe contrôle. Au contraire, le taux de triglycérides n'a pas changé de manière significative chez les rats des groupes (Mtz + Que) et (Mtz + Va) que ceux du groupe témoin.

Le traitement avec la quercétine ou la vanilline pendant 21 jours a permis de diminuer significativement ($p \leq 0.04$) le taux de triglycérides dans les lots (Mtz + Que) et (Mtz + Va) respectivement ; en comparaison avec le lot Mtz (tab.10 ; fig.42).



3.7. Protéines totales

La fig.43 montre que le taux des protéines totales chez les rats traités à la Mtz diminue significativement ($p \leq 0.04$) comparativement aux rats témoins, toutefois aucune signification n'a été enregistrée chez les rats des groupes (Mtz + Que) et (Mtz + Va) comparant toujours aux rats témoins. En outre, l'administration de la quercétine ou la vanilline chez les rats traités à la Mtz a induit une augmentation du taux des protéines totales ($p \leq 0.05$ et $p \leq 0.03$, respectivement) comparativement au groupe Mtz.

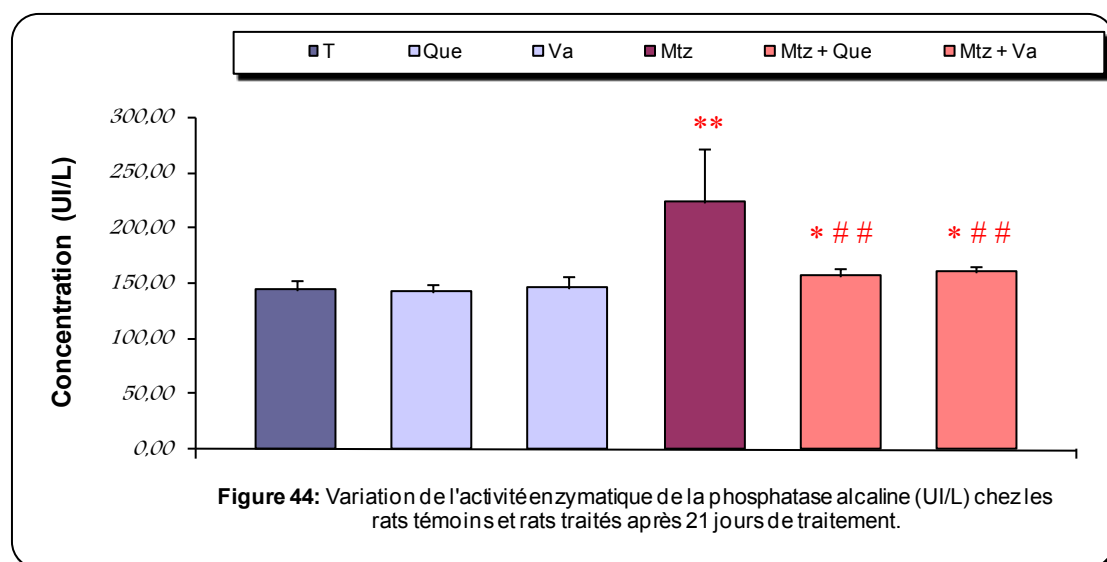
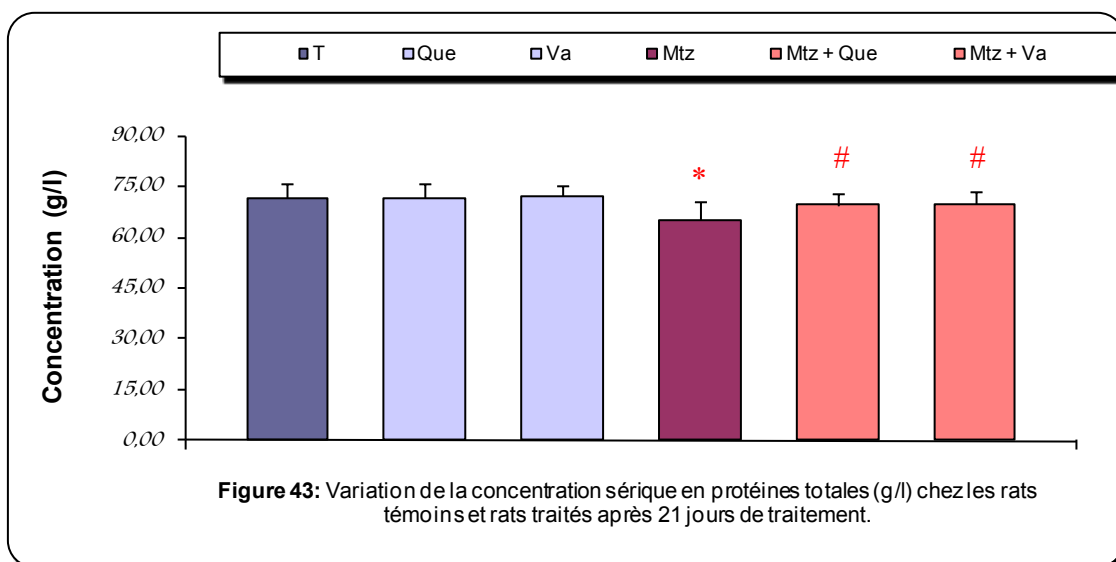
3.8. Phosphatase alcaline

Le dosage des concentrations sériques de la phosphatase alcaline (PAL), a montré une augmentation hautement significative ($p \leq 0.002$) chez les rats du groupe Mtz par rapport au groupe témoin. Cependant, une augmentation significative de la PAL a été signalée chez les animaux traités à la Mtz + Que ($p \leq 0.03$) et Mtz + Va ($p \leq 0.02$) comparativement au groupe T. Le traitement combiné de la métribuzine avec la quercétine ou la vanilline a diminué significativement le taux de la PAL ($p \leq 0.01$) par rapport à celui du groupe Mtz (tab.10 ; fig.44).

3.9. Transaminases

Le traitement des rats par la métribuzine a induit une augmentation hautement significative des transaminases AST ($p \leq 0.005$; fig.45) et ALT ($p \leq 0.002$; fig.46) comparant au groupe témoin, et une augmentation significative ($p \leq 0.02$) de la ALT chez les rats traités par la combinaison Mtz/Va, ainsi qu'une augmentation significative ($p \leq 0.04$) de la AST chez les rats traités par la combinaison Mtz/Que comparant aux rats témoins.

Le traitement à la quercétine ou la vanilline a significativement restauré le taux de ALT ($p \leq 0.001$ et $p \leq 0.04$, respectivement) chez les rats des groupes Mtz + Q et Mtz + Va par rapport aux rats du groupe Mtz. De même, une amélioration du taux de la AST a été également observée chez les rats traités à la combinaison Mtz + Que ($p \leq 0.03$) et Mtz + Va mais sans aucune différence significative par rapport aux rats Mtz (tab.10).

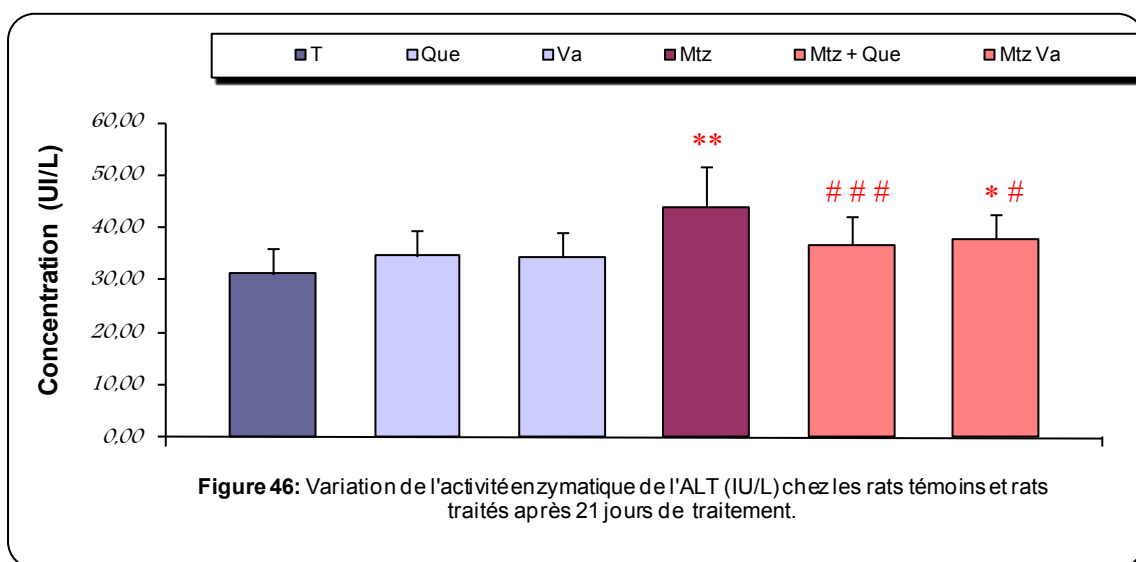
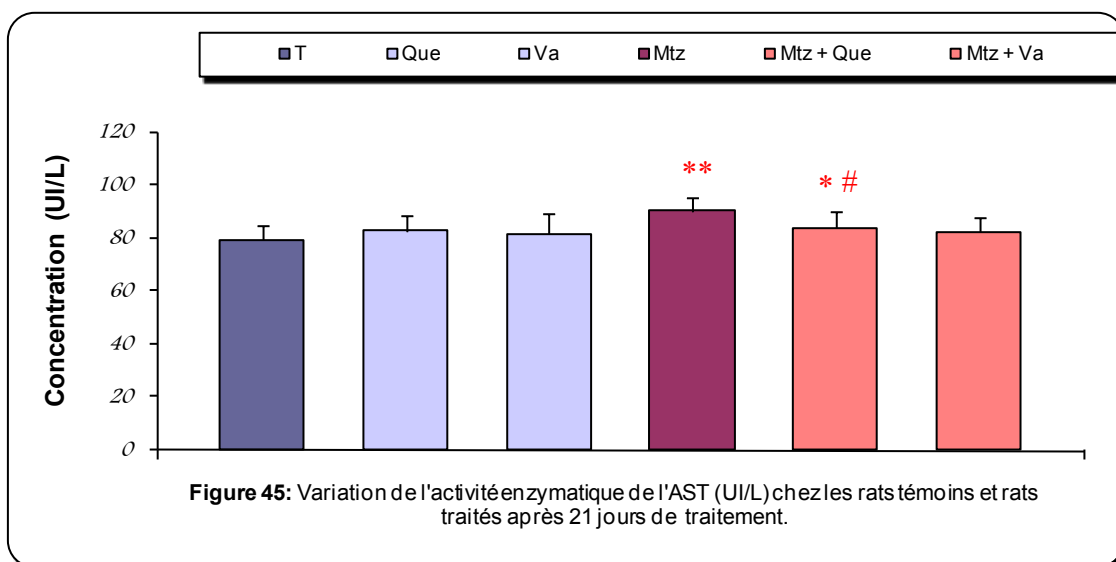


(*) : Différence significative comparant au témoin ($p \leq 0,05$).

(**) : Différence hautement significative comparant au témoin ($p \leq 0,01$).

(#) : Différence significative comparant au groupe métribuzine ($p \leq 0,05$).

(##) : Différence hautement significative comparant au groupe métribuzine ($p \leq 0,01$).



(*) : Différence significative comparant au témoin ($p \leq 0,05$).

(**) : Différence hautement significative comparant au témoin ($p \leq 0,01$).

(#) : Différence significative comparant au groupe métribuzine ($p \leq 0,05$).

(# # #) : Différence très hautement significative comparant au groupe métribuzine ($p \leq 0,01$).

L'étude des paramètres biochimiques a ainsi permis de montrer que, après une exposition à la métribuzine par voie orale, ce pesticide est capable d'induire des effets métaboliques délétères chez le rat.

À la lumière de ce qu'on a observé dans cette étude, l'administration subaiguë de la métribuzine conduit à divers désordres métaboliques impliquant une perturbation du métabolisme de glucose, du profil lipidique et une perturbation des enzymes hépatiques.

De même, les données expérimentales (Jamal et al., 2016 ; Abdel-Ghany et al., 2016 ; Al-Attar, 2015, Nwozo et al., 2015 ; Jestadi et al., 2014) montrent dans leur ensemble que les pesticides sont capables de perturber les mécanismes métaboliques et d'entraîner par conséquent des modifications métaboliques importantes dans différents organes.

D'après les résultats de notre étude il apparaît que le traitement des rats par la métribuzine provoque une perturbation de la concentration sanguine en glucose, reflétée par une hyperglycémie. Après administration de la métribuzine, l'augmentation de la concentration du glucose sanguin est également décrite par Chiali et al. (2013) chez le rat et par Velisek et al. (2008) chez le poisson.

Des travaux récents menés avec d'autres types de pesticides (Deka et Dutta, 2015 ; Ikpesu, 2015 ; Mehra et al., 2014) ont confirmé ce résultat et suggéré que l'action hyperglycémisante s'explique par une augmentation de la charge glycémique du sang qui en résulte de la stimulation de la glyco-génolyse hépatique. D'après ces auteurs, l'exposition aux pesticides entraîne une augmentation de la sécrétion d'hormones hyperglycémisantes (glucagon et adrénaline). Dans la mesure où ces hormones sont essentielles au maintien de l'homeostasie énergétique, leur augmentation entraîne une activation d'une voie métabolique utilisant des réserves énergétiques, ce qui permet une augmentation de la production de glucose endogène par le foie : glyco-génolyse.

Cependant, ces mêmes travaux suggèrent que d'autres mécanismes pourraient aussi expliquer cette augmentation de la glycémie. Ils ont été émis l'hypothèse que la baisse de l'activité de l'insuline (hormone hypoglycémisante), pourrait être la cause de l'hyperglycémie observée chez ces animaux.

Nous avons par ailleurs montré que le traitement avec la quercétine ou la vanilline entraîne une diminution de la glycémie chez les rats traités avec la métribuzine. La présence de diminution significative de la glycémie des animaux traités par la combinaison (Mtz + Que) et (Mtz + Va) comparativement aux animaux traités avec la métribuzine (Mtz) montre que ces deux polyphénols possèdent des propriétés antihyperglycémiantes.

Dans une autre étude, chez des souris rendues diabétiques par la streptozotocine, la quercétine administré à 10 mg.kg^{-1} , une fois par jour, a régularisé la glycémie après 4 semaines. Selon cette étude (Gomes et al., 2014), la quercétine peut avoir différentes actions conduisant à une diminution de la glycémie : stimulation de l'absorption du glucose par les tissus périphériques, augmentation de la glucokinase hépatique, augmentation de l'oxydation et du stockage du glucose, inhibition de la gluconéogenèse hépatique et la glycogénolyse.

Une autre étude (Wang et al., 2013) du même type a montré que le traitement avec la quercétine à une dose de 50 mg.kg^{-1} aboutissait à une diminution de la glycémie après l'administration chez des diabétiques de type I.

En ce qui concerne la vanilline aucune étude précédente, à notre connaissance, n'a démontré à ce jour, l'effet hypoglycémiant de la vanilline sur la glycémie. D'autres études seront donc nécessaires pour confirmer ce résultat.

Plusieurs études ont, pour leur part, observé une amélioration dans le niveau de la glycémie après supplémentation par de polyphénols. Entre autres, la consommation de l'extrait méthanolique de *Zygophyllum album* a abouti à une réduction de la glycémie chez des rats traités par un insecticide à base de deltaméthrine (Feriani et al., 2016).

L'effet hypoglycémiant des polyphénols est également démontré dans l'étude de (Al-Attar et Abu Zeid (2013). Dans cette étude, la consommation d'extraits de polyphénols provenant de thé (*Camellia sinensis*) et d'olive (*Olea europaea L.*) a mené à une diminution des concentrations plasmatiques en glucose des rats traités avec le diazinon, pesticide organophosphoré largement utilisé en agriculture.

Une autre étude (Newairy et Abdou, 2013) dans laquelle des rats ont été traités par le pesticide chlorpyrifos, a montré que le taux de la glycémie après traitement par la propolis, substance végétale très riche en bioflavonoïdes et polyphénols, était plus faible que celle observé dans le groupe traité seulement par le chlorpyrifos.

Le profil lipidique est également changé après exposition au métribuzine. Ainsi, un effet secondaire du traitement sur les lipides sanguins, est l'augmentation des concentrations sériques en cholestérol total et triglycérides chez les rats du groupe Mtz, ce qui vient confirmer les résultats d'une précédente étude menée par El-Demerdash et Nasr en 2014.

Comme le rappellent Lagrost et al. (2004), le foie constitue l'organe central de gestion du métabolisme et du transport des lipides. Il joue un rôle fondamental dans l'homéostasie du cholestérol et des triglycérides (Gautier et Legallais, 2009). Dans nos conditions expérimentales, l'hyperlipidémie observée après 21 jours de traitement par la métribuzine suggère donc que cette augmentation pourrait être due à un désordre du métabolisme des lipides probablement induit par un dysfonctionnement hépatique.

El-Demerdash et Nasr (2014) ont, quant à eux, suggéré que le déséquilibre du métabolisme du cholestérol pourrait résulter d'une augmentation de la synthèse hépatique de cholestérol ou d'une altération de la perméabilité membranaire des cellules hépatique par les pesticides, qui est souvent accompagnée d'un dysfonctionnement hépatique, entraînant ainsi une augmentation de cholestérol dans le sang.

Le taux des triglycérides, quant à lui, augmente de 17,89 % chez les rats traités avec la métribuzine. Selon El-Demerdash et Nasr (2014), le niveau élevé des TG dans le plasma est le résultat d'une activité réduite de la lipoprotéine lipase et la triglycéride lipase hépatique (enzymes lipolytiques).

Par ailleurs, la Que et la Va sont également bénéfiques pour réduire chez le rat les taux de cholestérol et de triglycéride. La baisse significative du profil lipidique observée chez les animaux traités par la combinaison (Mtz + Que) pendant 21 jours, ainsi que la vanilline (Mtz + Va) s'explique par l'effet hypocholestérolémiant et hypotriglycéridémiant de ces deux polyphénols.

L'effet antihyperlipidémique de la quercétine, a également été rapporté chez l'homme. En fait, des résultats semblables ont été notés par Egert et al en 2009 sur des sujets en surpoids ou obèses traités à une dose de 150 mg/kg de quercétine.

De même, chez des rats rendus hyperlipidémiques par un régime alimentaire riche en matière grasse, la vanilline donnée à la dose de 200 ou 400 mg/kg par voie orale pendant 45

jours, est à l'origine d'une diminution du cholestérol et des triglycérides sanguins (Belagali et al., 2013).

De modifications du taux des transaminases (AST, ALT) et de la phosphatase alcaline (PAL) ont été également constatées chez les animaux contaminés par la métribuzine. De part leur répartition essentiellement hépatique dans l'organisme, ces enzymes sont souvent considérées comme les marqueurs les plus sensibles de dommages hépatiques et de l'hépatotoxicité (Sidhu et al., 2014). La mesure de leur taux plasmatique peut permettre d'évaluer en partie la perte ou non des fonctions hépatiques suite à l'exposition d'hépatocytes à des substances potentiellement toxiques, donc de mesurer l'atteinte hépatocellulaire. En outre, les transaminases, en particulier l'ALT constituent des indicateurs fiables de la lyse et de la nécrose hépatocytaire (Gome et al., 2011).

Ainsi, nos résultats ont montré que la consommation de la métribuzine entraîne effectivement un dysfonctionnement de l'activité hépatique se traduisant par une élévation du taux des transaminases et de la phosphatase alcaline.

Ces résultats se montrent en accord avec ceux obtenus dans l'étude de Sidhu et al. (2014). Dans cette publication, une élévation du taux plasmatique des enzymes hépatiques (AST, ALT et PAL) traduisant une inflammation et éventuellement une nécrose hépatique est observée après administration du chlorpyrifos (insecticide) chez le rat. Cette nécrose hépatique a donc conduit à une libération du contenu enzymatique dans le sang.

D'autres paramètres biologiques sont également utiles dans l'interprétation du bilan hépatique, afin d'évaluer plus précisément la fonction hépatique. Le dosage de bilirubine est d'ailleurs un élément important de l'analyse d'un bilan hépatique perturbé : c'est un marqueur de cholestase mais aussi d'insuffisance hépatocellulaire (Layné et Guyader, 2003).

Il est bien connu que la bilirubine est le produit de dégradation de l'hème de l'hémoglobine (Green et Flamm, 2002). Son excrétion de l'organisme est réalisée de façon prédominante par sécrétion dans la bile. Elle est insoluble et nécessite une transformation chimique par le foie avant son excrétion pour être solubilisée : la glucurono-conjugaison (Pratt et Kaplan, 2005). Les normes de la bilirubine représentent la balance entre la production (dégradation de l'hémoglobine) et son élimination hépatique (Limdi et Hyde, 2003). Une hémolyse ou une perturbation de la fonction hépatique peuvent donc contribuer au développement de l'hyperbilirubinémie (Green et Flamm, 2002).

En tenant compte de nos résultats, nous avons constaté que la métribuzine a entraîné une augmentation significative du niveau de bilirubine, chez les rats du groupe Mtz, suggérant une anomalie de fonctionnement du foie ou une augmentation de la dégradation des globules rouges (hémolyse).

Cette observation a été confirmée chez un modèle animal, le rat Sprague Dawley avec un autre pesticide, le diazinon (DZN). En effet, à la suite d'un traitement au DZN sur les mâles de ce type de rats, une réduction drastique du niveau de bilirubine plasmatique a été observée. D'après les auteurs de cette étude, ce résultat laisse suggérer que la diminution de la captation de la bilirubine par le foie ou l'augmentation de la production de bilirubine (dégradation de l'hémoglobine) peut avoir un effet sur le niveau de bilirubine chez le rat (El-Demerdash et Nasr, 2014).

Avec les niveaux d'aspartate amino transférase (AST), d'alanine amino transférase (ALT), de la phosphatase alcaline (ALP), et de la bilirubine, le niveau de protéines totales constitue également un des paramètres utilisés pour l'évaluation du fonctionnement du foie (Elzoghby et al., 2014).

Bien qu'elles soient majoritairement synthétisées dans le foie (Elzoghby et al., 2014), la diminution de la concentration sérique des protéines totales observée chez les rats traités uniquement par la métribuzine (Mtz), pourrait être due à une perturbation de la synthèse des protéines dans le foie, liée probablement à un dysfonctionnement hépatique (Elzoghby et al., 2014).

Toutefois, les rats des groupes (Mtz + Que) et (Mtz + Va) ont montré le pouvoir protecteur de la quercétine et la vanilline contre l'hépatotoxicité induite par la métribuzine. L'activité hépatoprotectrice a été observée par la restauration des concentrations sériques des transaminases, de la phosphatase alcaline, de la bilirubine et des protéines.

Les propriétés hépatoprotectrices de la quercétine (Krishnappa et al., 2014) et la vanilline (Makni et al., 2011), ont déjà été reportées. Dans ces deux études, l'histopathologie du tissu hépatique a appuyé les résultats biologiques.

Selon ces derniers, l'effet hépatoprotecteur de la quercétine a été évalué chez le rat vis-à-vis de l'hépatotoxicité aiguë induite par le tétrachlorure de carbone (CCl₄). La quercétine a

entraîné une normalisation du bilan hépatique (AST, ALT, ALP, bilirubine et les protéines totales) à une dose de 20 mg.kg⁻¹.

De même, après administration orale de CCl₄ à des rats, l'activité d'enzymes sériques marqueurs de la souffrance hépatique comme l'aspartate amino transférase (AST) et l'alanine amino transférase (ALT), est nettement diminuée par un prétraitement avec la vanilline au dose de 150 mg.kg⁻¹.

En outre, la quercétine à également présentée un profil thérapeutique très intéressant avec une activité antihépatotoxique à une dose de 20 mg/kg, contre la toxicité hépatique du melphalan, médicament étudié du fait de son action déjà connue sur le foie (Olayinka et al., 2014).

D'autres travaux récents, ont été aussi réalisés pour évaluer la protection que les polyphénols peuvent exercer vis-à-vis des dommages hépatiques causés par les pesticides. Mehri et al. (2016), ont par exemple montré le pouvoir protecteur de l'extrait de thé vert contre l'hépatotoxicité induite par l'exposition des rats au malathion, insecticide organophosphoré utilisé pour lutter contre divers insectes et acariens. Mossa et al. (2015), dans leur étude visant à déterminer l'effet hépatoprotecteur de l'huile de *Cedrelopsis Grevei*, riches en polyphénols, contre la toxicité de cyperméthrine (insecticide).

Par ailleurs, d'autres résultats obtenus dans notre expérimentation ont montré que la Mtz est un agent néphrotoxique. En effet, l'étude de biomarqueurs de néphrotoxicité classiquement utilisés (créatinine, urée) a montré que le traitement des rats avec la métribuzine pendant 3 semaines a entraîné une élévation significative du taux d'urée et de créatinine sérique. Après 3 mois de contamination chronique à la métribuzine, Chiali et al. (2013), ont ainsi affirmé l'existence d'un effet néphrotoxique avéré chez des rats traités à faible (1,3 mg/kg) ou à forte dose (13 mg/kg) de Mtz.

Comme présenté par diverse études (Al-Attar, 2015 ; Nwozo et al., 2015 ; Sief et al., 2015 ; Nazam et al., 2015 ; Jamal et al., 2016), un risque similaire de néphrotoxicité a aussi été rapporté avec d'autres pesticides à usage phytosanitaire. Il semblerait donc que les pesticides peuvent causer des effets toxiques dans d'autres tissus ou organes comme les reins.

Cependant, l'administration concomitante de la métribuzine et de la quercétine (Mtz + Que) ou la vanilline (Mtz + Va), a permis de réduire significativement le taux sérique de l'urée et de la créatinine, par rapport aux animaux traités exclusivement à la métribuzine,

suggérant que la quercétine et la vanilline protégeraient les reins de la toxicité due à la métribuzine.

Dans de précédentes études (Olayinka et al., 2014 ; Seiva et al., 2012), la quercétine a aboutit également à une amélioration des fonctions des reins chez des rats ayant une insuffisance rénale. Tandis qu'aucune étude, à notre connaissance, ne s'est intéressée au rôle néphroprotecteur de la vanilline.

Enfin, nos travaux ainsi que les travaux d'autres équipes de recherche qui ont été menées sur les polyphénols (Rajagopal et al., 2013), indiquent clairement que ces composés possèdent un potentiel néphroprotecteur qui justifie son développement comme nouveau composé de phytothérapie.

4. Évaluation des marqueurs du stress oxydatif dans certains organes

4.1. Foie

4.1.1. Taux du Glutathion réduit (GSH)

Le traitement des rats par la métribuzine à une dose de 133,33 mg/kg de poids corporel pendant 21 jours, entraîne une diminution hautement significative ($p \leq 0.003$) de la teneur cellulaire en glutathion dans le foie (- 27,43%) comparant au groupe témoin. Cependant, une diminution non significative de GSH a été observée chez les animaux traités à la combinaison (métribuzine + quercétine ou vanilline) comparativement au groupe T. Le traitement à la quercétine Mtz + Que ou la vanilline Mtz + Va augmente significativement le niveau de GSH chez les rats ($p \leq 0.05$ et $p \leq 0.03$, respectivement) comparativement à ceux traités à la Mtz (tab.11; fig.47).

4.1.2. Activité de la Glutathion peroxydase (GPx)

D'après le tableau 11 et la figure 47, on constate que le traitement des rats par la métribuzine provoque une diminution hautement significative ($p \leq 0.002$) de l'activité enzymatique de la glutathion peroxydase (GPx) dans le foie (- 34,78) comparant au groupe témoin. En plus, aucune différence significative n'est apparue entre les groupes qui ont reçu la combinaison (métribuzine + quercétine ou vanilline) et le groupe témoin. Par ailleurs, les rats du groupe Mtz + Que et Mtz + Va ont montré un accroissement significatif de l'activité de la GPx ($p \leq 0.003$ et $p \leq 0.002$, respectivement) par rapport à ceux du groupe Mtz.

4.1.3. Peroxydation lipidique

La déplétion de la défense antioxydante hépatique a été associée par une peroxydation lipidique importante, révélée par une augmentation hautement significative ($p \leq 0.002$) du taux du malondialdéhyde (+ 19,31 %), chez les rats traités par la métribuzine par rapport à ceux des rats témoins. De même, les rats du groupe Mtz + Que et Mtz + Va ont montré une augmentation de la peroxydation lipidique, mais sans aucune différence significative comparativement à ceux du groupe témoin. L'administration de la quercétine (Que) ou la vanilline (Va) chez les rats des groupes Mtz + Que et Mtz + Va, a induit une réduction significative de la peroxydation lipidique ($p \leq 0.001$ et $p \leq 0.02$, respectivement) par rapport aux animaux recevant la Mtz (tab.11 ; fig.47).

4.2. Reins

4.2.1. Taux du Glutathion réduit (GSH)

Au niveau des reins, les animaux des groupes Mtz et Mtz + Va ont révélé une réduction significative du taux de GSH ($p \leq 0.003$ et $p \leq 0.04$, respectivement) en comparaison à ceux du groupe témoin. Par contre, le taux GSH n'a pas significativement changé chez les rats du groupe (Mtz + Que) comparant aux rats témoins. La quercétine (Que) et la vanilline (Va) administrés chez les rats des groupes (Mtz + Que) et (Mtz + Va) augmentent significativement le taux de GSH ($p \leq 0.05$ et $p \leq 0.03$, respectivement) comparativement aux animaux du groupe Mtz (tab.11 ; fig.48).

4.2.2. Activité de la Glutathion peroxydase (GPx)

L'évaluation de l'activité de GPx au niveau des reins est illustrée dans la fig.48. Nous avons enregistré une diminution significative ($p \leq 0.02$) de l'activité de GPx (- 18,75 %) dans le groupe traité à la Mtz par rapport au groupe témoin. Cependant, aucune signification n'a été enregistrée dans les groupes (Mtz + Que) et (Mtz + Va) comparant au témoin. Par ailleurs, la supplémentation de la quercétine ou la vanilline chez les rats traités à la Mtz a provoqué une augmentation de l'activité de la GPx comparativement aux animaux traités à la Mtz. Mais, aucune différence significative n'a été enregistrée entre eux (tab.11).

4.2.3. Peroxydation lipidique

Un accroissement significatif ($p \leq 0.001$) de la peroxydation lipidique rénale (+ 19,13 %) a été signalé chez les rats du groupe Mtz en comparaison aux rats témoins. chez les rats traités par la métribuzine et ayant reçu une injection de quercétine ou vanilline, aucune variation significative du taux de peroxydation lipidique par rapport au témoin n'a été observée. D'autre part, la peroxydation lipidique a significativement diminué chez les rats des groupes Mtz + Que ($p \leq 0.02$) et Mtz + Va ($p \leq 0.01$) par rapport à ceux du groupe Mtz (tab.11 ; fig.48).

Tableau 11 : Variation de glutathion (nmol/mg prot), de MDA (nmol/mg prot) et de l'activité enzymatique de la GPx (μ mol GSH/mg prot) dans les organes (Foie et rein) chez les rats témoins et traités après 21 jours de traitement.

Paramètres	Organes	Les lots expérimentaux					
		Témoin	Que	Va	Mtz	Mtz + Que	Mtz + Va
GSH (n mol / mg prot)	Foie	83,53 ± 8,54	81,61 ± 7,09	77,75 ± 8,53	60,62 ± 7,34 **	70,82 ± 12,30 #	74,04 ± 9,87 #
	%	-	- 2,30 %	- 6,92 %	- 27,43 %	- 15,22 %	- 11,36 %
	Reins	71,06 ± 4,60	71,23 ± 7,04	71,46 ± 4,75	58,48 ± 5,83 **	67,04 ± 8,10 #	65,97 ± 6,25 *, #
	%	-	+ 0,24 %	+ 0,56 %	- 17,70 %	- 5,66 %	- 7,16 %
GPx (μ mol GSH / mg prot)	Foie	0,23 ± 0,03	0,24 ± 0,02	0,23 ± 0,02	0,15 ± 0,03 **	0,21 ± 0,03 ##	0,20 ± 0,02 ##
	%	-	+ 4,35 %	0 %	- 34,78 %	- 8,69 %	- 13,04 %
	Reins	0,16 ± 0,02	0,17 ± 0,02	0,18 ± 0,02	0,13 ± 0,02 *	0,15 ± 0,03	0,15 ± 0,03
	%	-	+ 6,25 %	+ 12,5 %	- 18,75 %	- 6,25 %	- 6,25 %
MDA (n mol / mg prot)	Foie	1,45 ± 0,13	1,39 ± 0,19	1,41 ± 0,13	1,73 ± 0,12 **	1,48 ± 0,08 ###	1,56 ± 0,13 #
	%	-	- 4,14 %	- 2,76 %	+ 19,31 %	+ 2,07 %	+ 7,59 %
	Reins	1,15 ± 0,14	1,11 ± 0,27	1,11 ± 0,19	1,37 ± 0,05 ***	1,19 ± 0,15 #	1,16 ± 0,16 ##
	%	-	- 3,48 %	- 3,48 %	+ 19,13 %	+ 3,48 %	+ 0,87 %

Différence significative : tous les groupes traités par rapport au témoin (* p ≤ 0,05, ** p ≤ 0,01, *** p ≤ 0,001). Les groupes (Mtz + Que) et (Mtz + Va) par rapport au groupe métribuzine (# p ≤ 0,05, ## p ≤ 0,01, ### p ≤ 0,001).

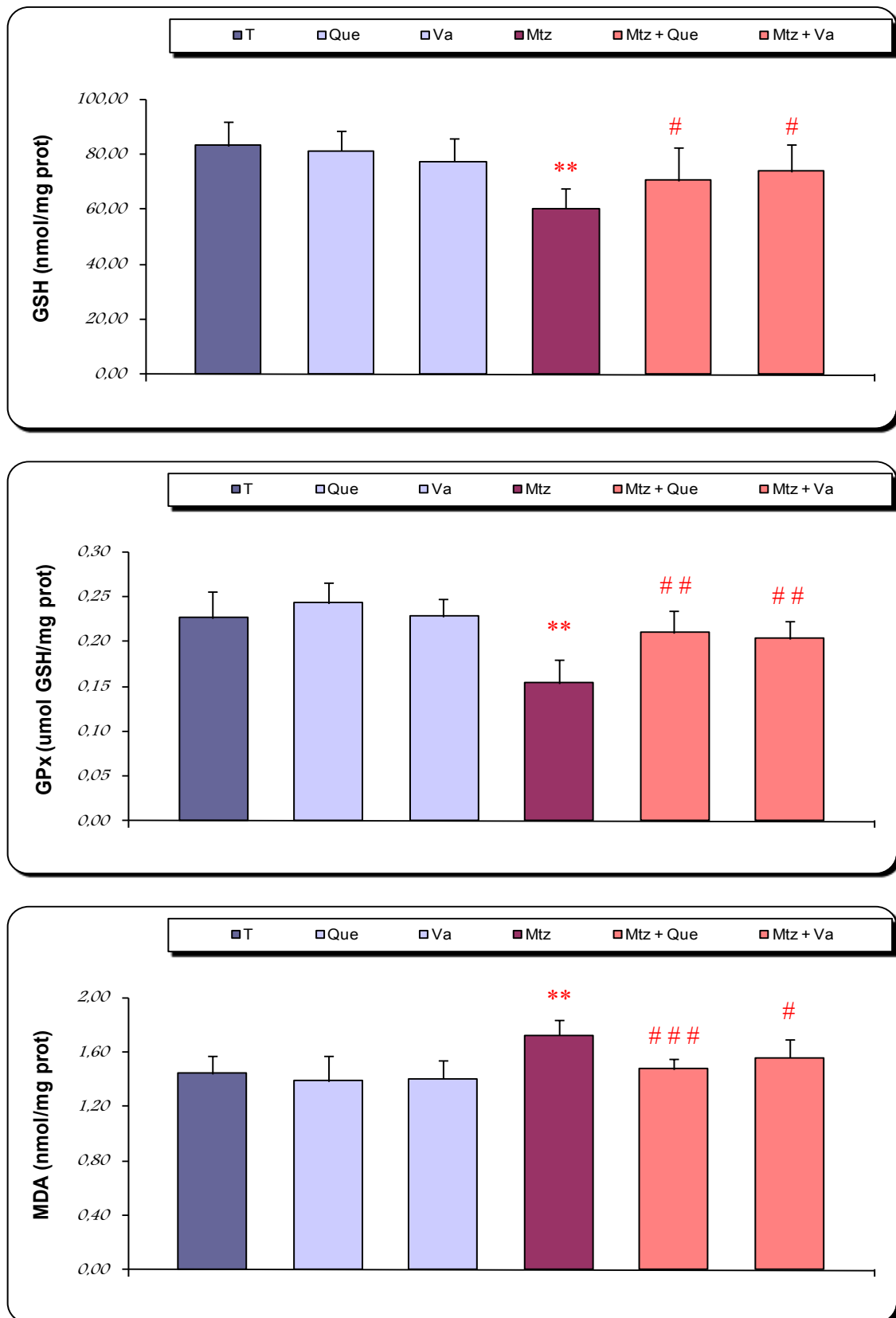


Figure 47 : Taux du glutathion réduit (GSH), de glutathion peroxydase (GPx) et de malondialdéhyde (MDA) hépatiques chez les rats témoins et rats traités après 21 jours de traitement.

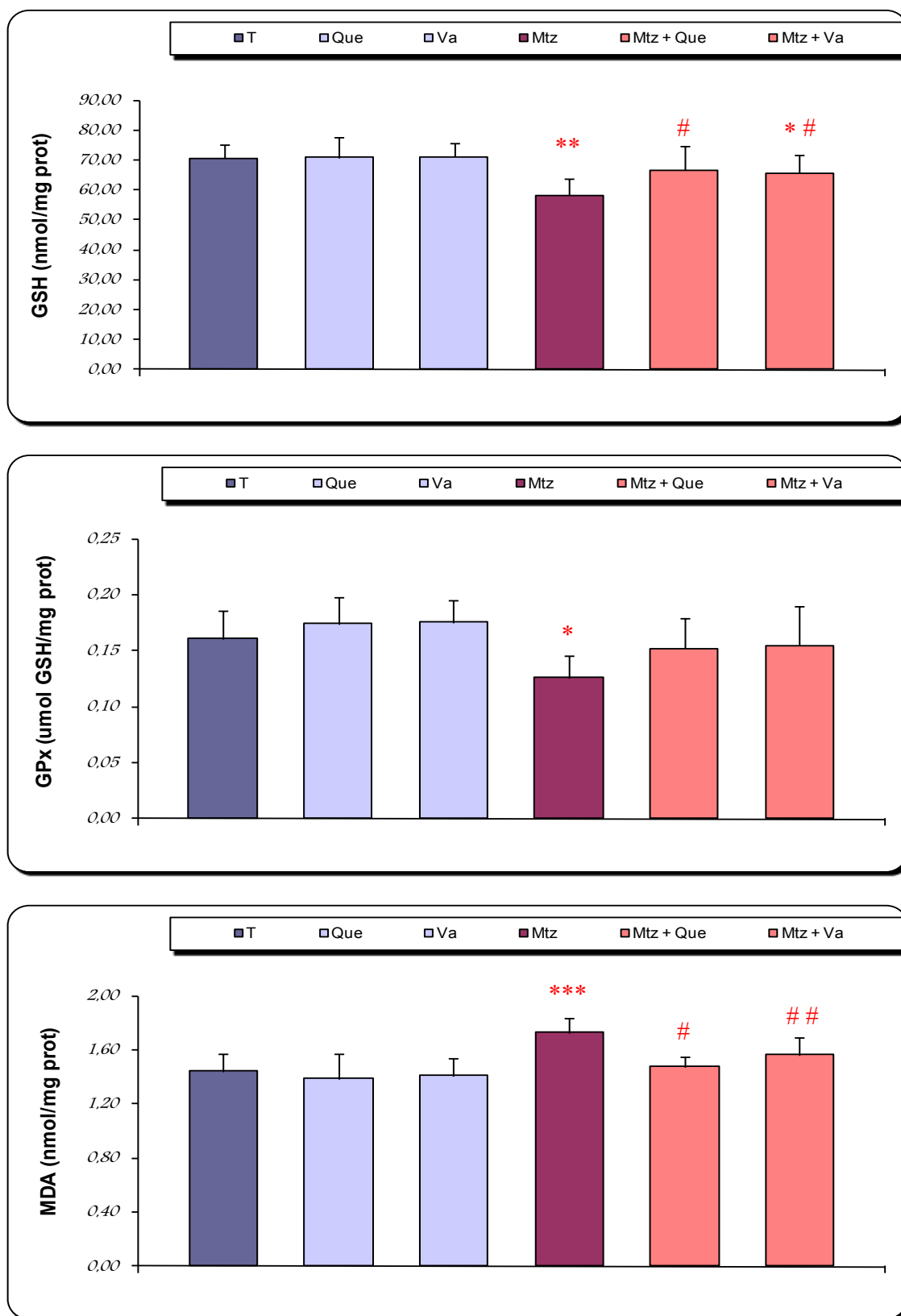


Figure 48 : Taux du glutathion réduit (GSH), de glutathion peroxydase (GPx) et de malondialdéhyde (MDA) rénales chez les rats témoins et rats traités après 21 jours de traitement.

4.3. Cerveau

4.3.1. Taux du Glutathion réduit (GSH)

Le traitement subaiguë des rats par la métribzine induit une diminution significative ($p \leq 0,005$) de la teneur cérébrale en glutathion réduit (- 14.59 %) par rapport à ceux du groupe témoin. Une légère diminution du taux de GSH a été également observée chez les rats des groupes traités à la combinaison (Mtz + Que) et (Mtz + Va) comparant aux rats du groupe témoin. L'injection de la Que à 50 mg/kg ou la vanilline à 150 mg/kg de poids corporel chez les rats mâles traités à la Mtz a provoqué une augmentation non significative de la teneur cérébrale en GSH comparativement au groupe Mtz (tab.12 ; fig.49).

4.3.2. Activité de la Glutathion peroxydase (GPx)

D'après la fig.49, l'activité de la GPx diminue significativement ($p \leq 0.02$) chez les rats du groupe Mtz (- 21,05 %) par rapport aux rats témoins. une augmentation non significative de la glutathion peroxydase tissulaire était observée dans le groupe traité par Mtz + Que et Mtz + Va, par rapport au groupe témoin. Les animaux recevant la vanilline (Mtz + Va) ont montré une élévation statistiquement significative ($p \leq 0.02$) de l'activité de GPx comparativement au groupe Mtz. De même, une amélioration de l'activité GPx par supplémentation de la quercétine a été également observée chez les rats du groupe (Mtz + Que) par rapport aux rats du groupe Mtz, mais sans signification statistique entre les deux (tab.12).

4.3.3. Peroxydation lipidique

Le traitement par la dose de 133,33 mg/kg de métribuzine, a donné une augmentation significative ($p \leq 0.02$) du malondialdéhyde (+ 20 %) dans le cerveau en comparant au témoin. Par contre, aucune variation significative des moyennes du MDA n'a été observée chez les rats recevant le traitement combiné de la (Mtz + Que) et (Mtz + Va) comparant au lot témoin. Les rats traités à la (Mtz + Que) et (Mtz + Va) montraient une diminution relative statistiquement non significative de la peroxydation lipidique (10,67 et -15,28%, respectivement) comparant aux rats traités seulement à la Mtz (tab.12 ; fig.49).

4.4. Testicules

4.4.1. Taux du Glutathion réduit (GSH)

Une déplétion significative ($p \leq 0.02$) du taux de GSH réduit (- 22,97 %) a été enregistrée chez les animaux du groupe Mtz par rapport au témoin. En revanche, aucun effet de la Mtz sur le taux du GSH testiculaire n'a été montré chez les rats des groupes (Mtz + Que) et (Mtz + Va) comparant aux rats du groupe témoin. Chez les groupes (Mtz + Que) et (Mtz + Va), le taux GSH a été amélioré davantage ($p \leq 0.02$ et $p \leq 0.01$, respectivement) en comparaison avec le groupe Mtz (tab.12 ; fig.50).

4.4.2. Activité de la Glutathion peroxydase (GPx)

Nos résultats indiquent une diminution significative ($p \leq 0.002$) de l'activité de la GPx (- 16,67 %) chez les rats traités à la métribuzine comparativement aux rats témoins. Cependant, en présence de Que ou Va l'activité de la GPx n'a pas changé de façon significative chez les rats des groupes (Mtz + Que) et (Mtz + Va) en comparaison avec le témoin. Ainsi, les rats des groupes (Mtz + Que) et (Mtz + Va) ont présenté une élévation statistiquement significative de l'activité de GPx ($p \leq 0.02$) par rapport aux rats du groupe Mtz (tab.12 ; fig.50).

4.4.3. Peroxydation lipidique

En comparaison avec le groupe témoin, une augmentation significative ($p \leq 0.01$) du taux de malondialdéhyde (+ 19,05 %) au niveau des testicules a été observée chez les rats traités à la Mtz en comparaison avec ceux des rats témoins. En association avec la quercétine ou la vanilline, la métribuzine n'a aucun effet sur le taux de MDA en comparant avec le groupe témoin. La métribuzine a cependant entraîné une diminution significative du taux de peroxydation lipidique testiculaire chez les rats des groupes Mtz + Que ($p \leq 0.04$) et Mtz + Va ($p \leq 0.05$) par rapport au groupe Mtz (tab.12 ; fig.50).

Tableau 12 : Variation de glutathion (nmol/mg prot), de MDA (nmol/mg prot) et de l'activité enzymatique de la GPx (μ mol GSH/mg prot) dans les organes (cerveau et testicules) chez les rats témoins et traités après 21 jours de traitement.

Paramètres	Organes	Les lots expérimentaux					
		Témoin	Que	Va	Mtz	Mtz + Que	Mtz + Va
GSH (n mol / mg prot)	Cerveau	72,15 ± 6,70	72,52 ± 8,19	70,83 ± 8,25	61,62 ± 5,09 **	70,09 ± 10,41	69,12 ± 8,32
	%	-	+ 0,51 %	- 1,83 %	- 14,59 %	- 2,85 %	- 4,20 %
	Testicules	54,06 ± 10,77	53,83 ± 6,45	51,39 ± 9,35	41,64 ± 4,39 *	49,68 ± 6,94 #	51,70 ± 6,11 #
	%	-	- 0,42 %	- 4,94 %	- 22,97 %	- 8,10 %	- 4,36 %
GPx (μ mol GSH / mg prot)	Cerveau	0,19 ± 0,03	0,21 ± 0,02	0,20 ± 0,03	0,15 ± 0,03 *	0,18 ± 0,02	0,21 ± 0,04 #
	%	-	+ 10,53 %	+ 5,26 %	- 21,05 %	- 5,26 %	+ 10,53 %
	Testicules	0,12 ± 0,02	0,13 ± 0,03	0,15 ± 0,02	0,10 ± 0,01 **	0,12 ± 0,02 #	0,14 ± 0,04 #
	%	-	+ 8,33 %	+ 25 %	- 16,67 %	0 %	+ 16,67 %
MDA (n mol / mg prot)	Cerveau	0,60 ± 0,04	0,58 ± 0,06	0,61 ± 0,06	0,72 ± 0,13 *	0,61 ± 0,12	0,64 ± 0,05
	%	-	- 3,33 %	+ 1,67 %	+ 20 %	+ 1,67 %	+ 6,67 %
	Testicules	0,42 ± 0,07	0,41 ± 0,06	0,38 ± 0,04	0,50 ± 0,06 **	0,43 ± 0,05 #	0,40 ± 0,07 #
	%	-	- 2,38 %	- 9,52 %	+ 19,05 %	+ 2,38 %	- 4,76 %

Différence significative : tous les groupes traités par rapport au témoin (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$). Les groupes (Mtz + Que) et (Mtz + Va) par rapport au groupe métribuzine (# $p \leq 0,05$, # $p \leq 0,01$).

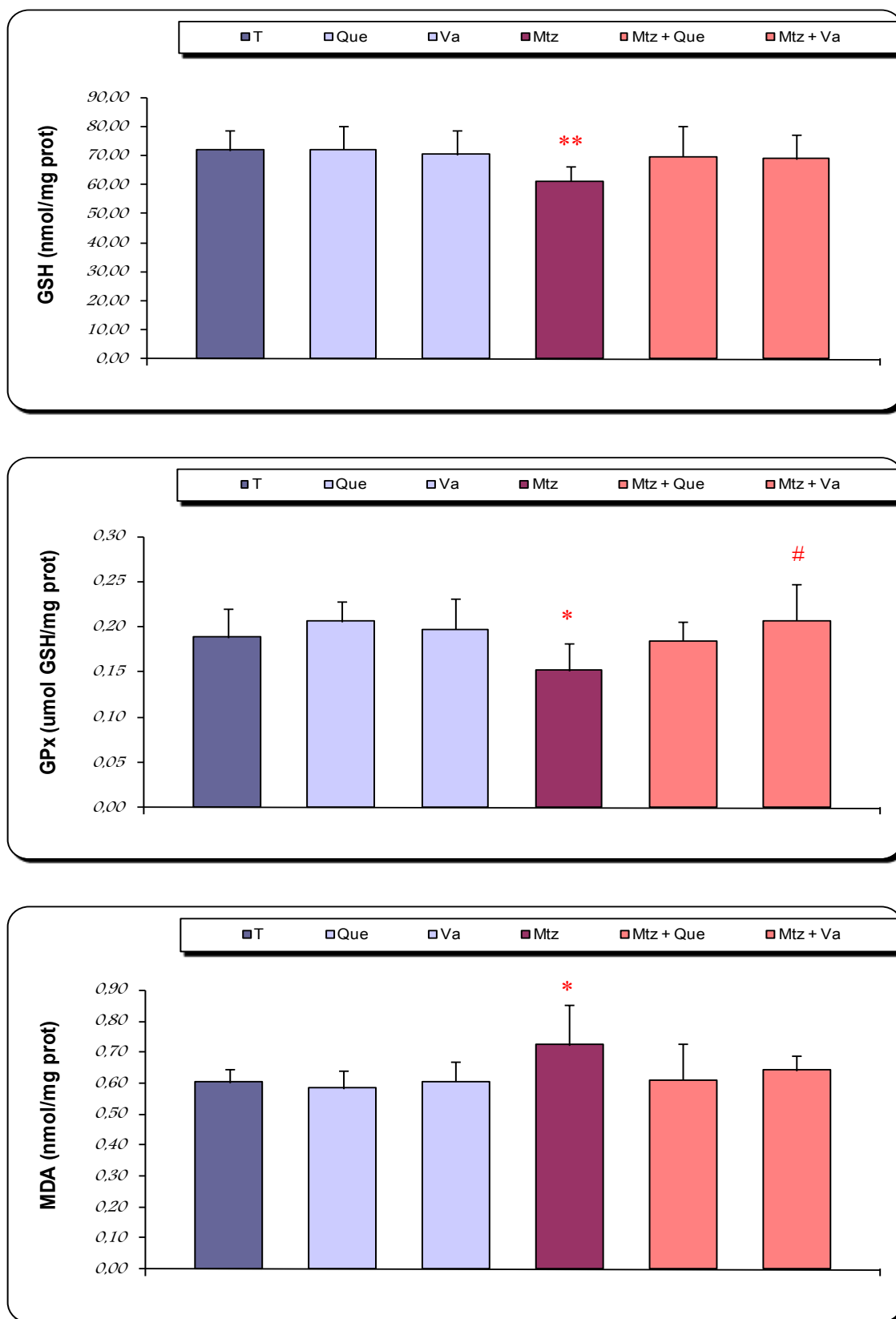


Figure 49 : Taux du glutathion réduit (GSH), de glutathion peroxydase (GPx) et de malondialdéhyde (MDA) cérébraux chez les rats témoins et rats traités après 21 jours de traitement.

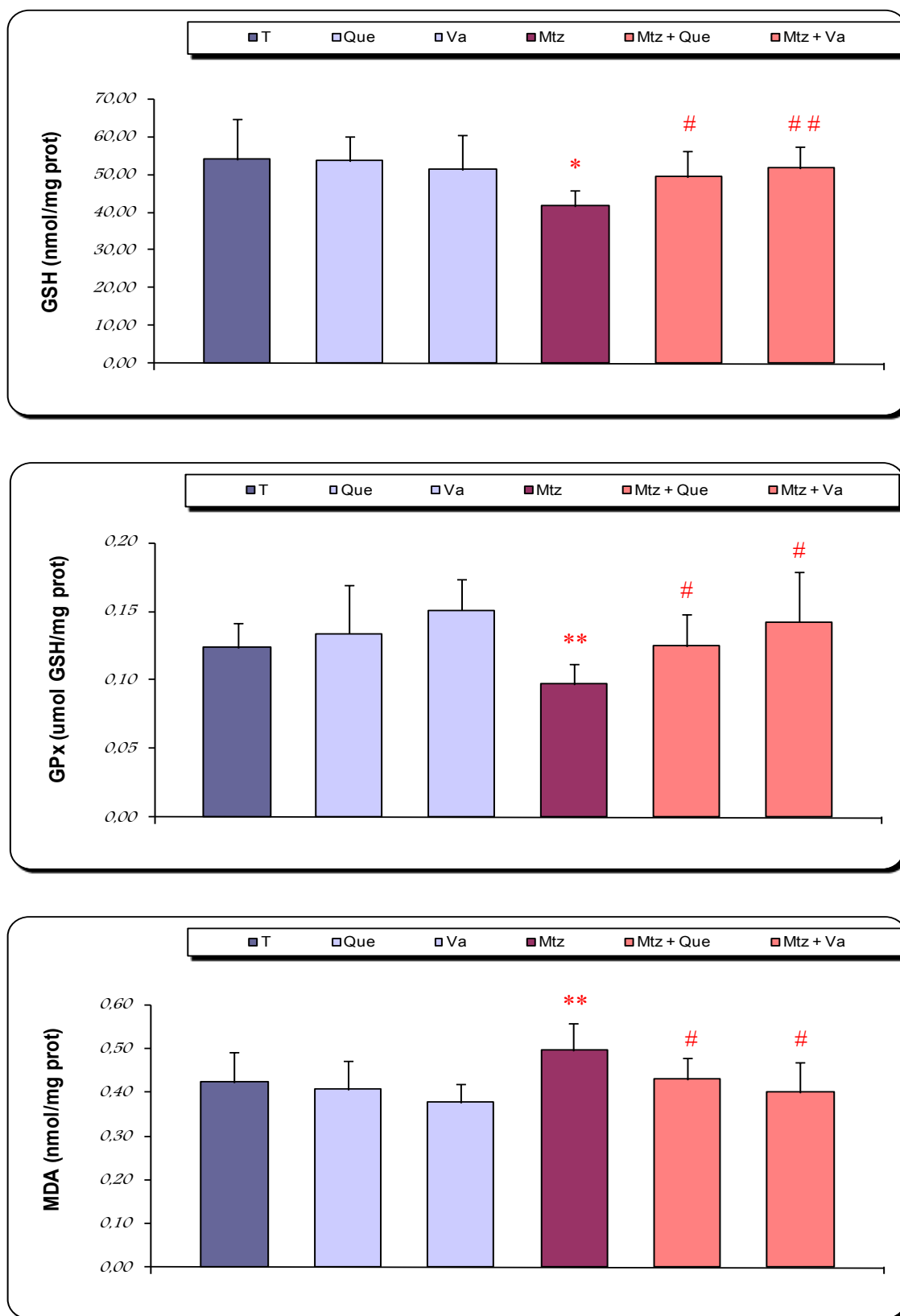


Figure 50 : Taux du glutathion réducté (GSH), de glutathion peroxydase (GPx) et de malondialdéhyde (MDA) testiculaires chez les rats témoins et rats traités après 21 jours de traitement.

5. Etude histologique

5.1. Foie

La figure 51 présente les coupes histologiques de foie des différents groupes d'animaux expérimentaux, observées au grossissement 40. Le foie des rats du lot 1, témoin normal présente une architecture lobulaire normale marquée par la présence de travées hépatocytaires (H) séparées par des sinusoides (S). Chez les animaux du lot 2 traités avec Que, du lot 3 traités avec l'Va, du lot 5 traités avec la combinaison (Mtz + Que) et du lot 6 traités avec la (Mtz + Va), l'architecture hépatique est globalement conservée.

Chez les animaux du lot 4, intoxiqués avec la Mtz, l'organisation du foie est méconnaissable (figure 51). On note une nécrose hépatocytaire massive avec dégénérescence vacuolaire (dv) autour d'une veine centrolobulaire (VC). Cette nécrose hépatocytaire est accompagnée d'une congestion des sinusoides. Après un traitement préventif à l'Que ou la Va des animaux intoxiqués par la Mtz (lot 5 et 6), la nécrose hépatocytaire observée est moins importante que chez les animaux intoxiqués et non traités.

5.2. Reins

Comme illustré sur la figure 52, l'examen histologique des reins de rats témoins a montré un parenchyme rénal normal avec des glomérules et des tubules bien définis. Cependant, le traitement des rats avec la métribuzine (Mtz) a montré des changements dégénératifs dans l'épithélium tubulaire du cortex rénal. Les tubules proximaux et distaux sont gonflés et dilatés. Les lumières des tubules ne sont plus distingués. Les limites séparant les glomérules des tubules sont rompues et les glomérules semblent complètement désorganisés (une diminution de la congestion des vaisseaux sanguins, montrant un grand espace de Bowman). Les reins des animaux de tous les autres groupes expérimentaux gardent en général un aspect identique à celui observé dans le rein normal.

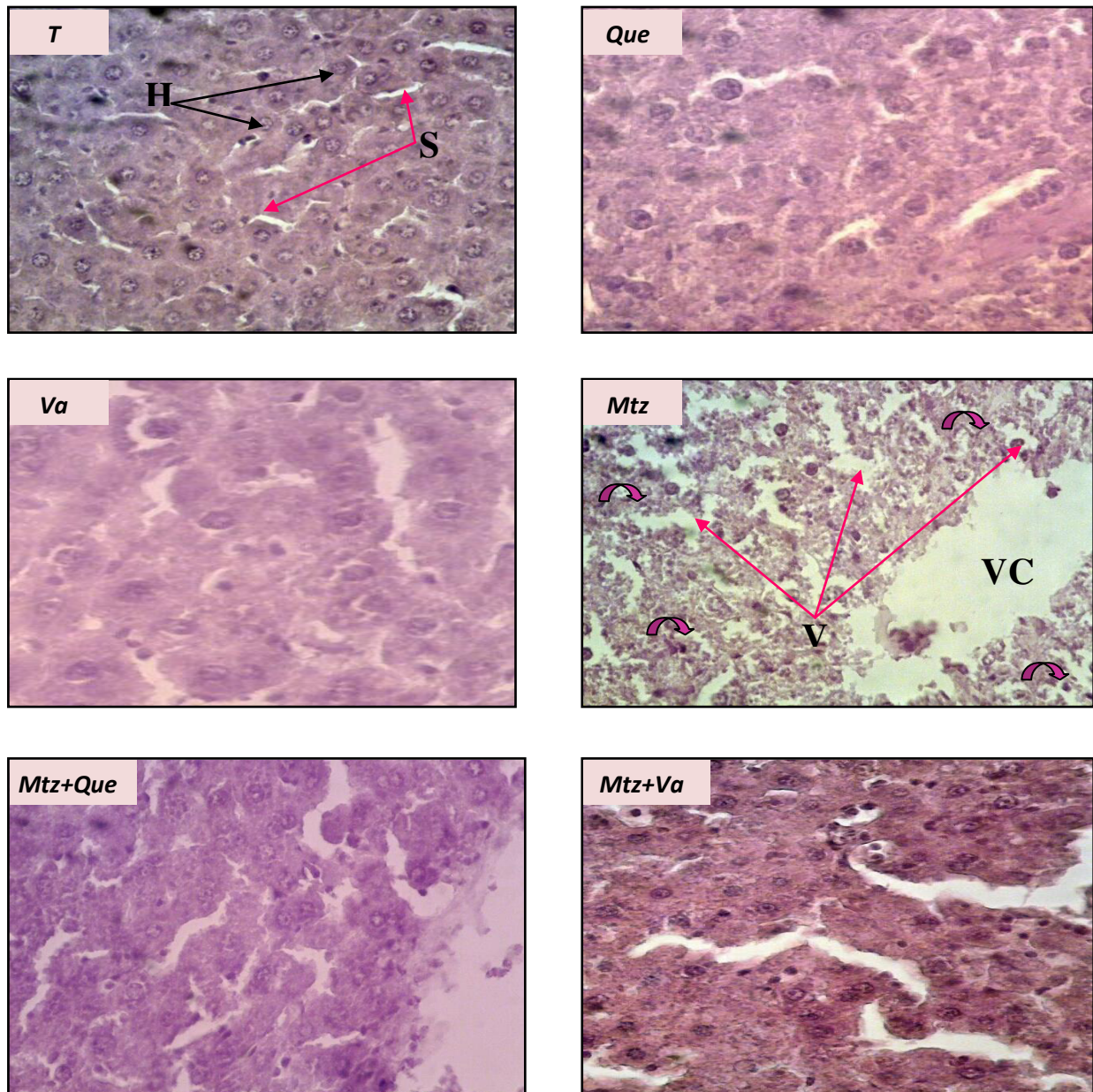



Figure 51 : Coupes histologiques du foie de rat témoin et rats traités après 21 jours de traitement (G X 40). H : hépatocytes ; S : sinusoides ; V : vacuoles ; VC : veine centrolobulaire ;  : nécroses.

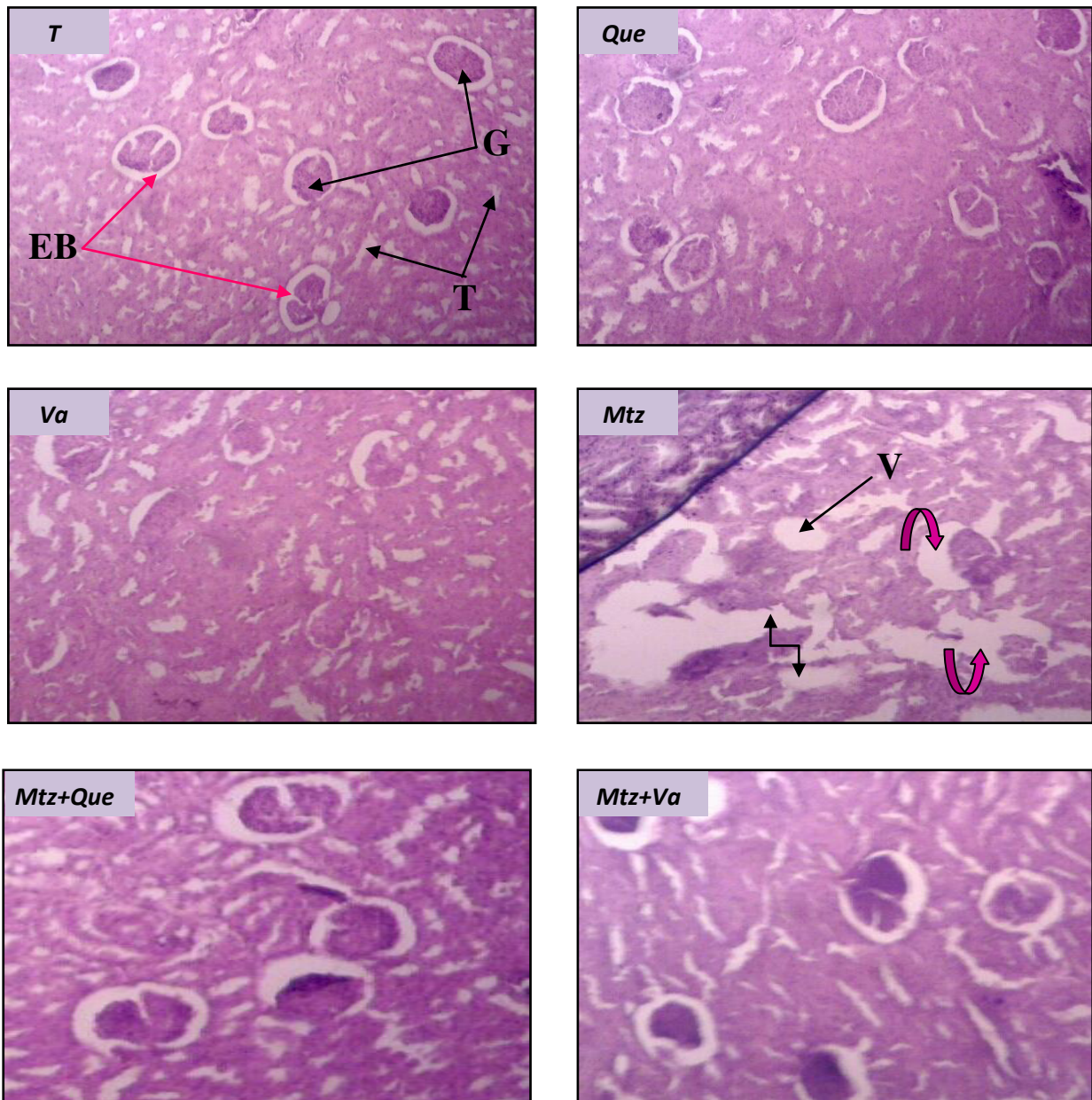




Figure 52 : coupes histologiques du rein de rat témoin et rats traités après 21 jours de traitement (G X 40). **G** : glomérules ; **EB** : espace de bowman ; **T** : tubes ; **V** : vacuole ;  : grand espace de bowman ;  : tubes gonflés et dilatés.

A la suite d'une étude bibliographique sur la capacité des pesticides d'induire un stress oxydant au niveau des organismes exposés, ainsi que sur les biomarqueurs de stress oxydant, notre choix s'est porté sur l'évaluation de trois marqueurs de stress oxydant : le MDA ou malondialdéhyde, l'activité de l'enzyme (glutathion peroxydase) et la concentration d'une molécule clé du système antioxydant (le glutathion).

La validation de biomarqueurs de stress oxydant nécessite également, pour un organisme et un type de polluant donnés, d'identifier les organes cibles potentiels des toxiques. Pour cela, les organes que nous avons choisis pour l'étude de biomarqueurs de stress oxydant, sont le foie et les reins, en raison de leurs rôles dans le processus de détoxification des xénobiotiques. Nous nous sommes attardés également sur deux autres types tissulaires d'intérêt : les gonades (testicules) et le cerveau.

Au travers de cette étude, nous avons montré que les paramètres du stress oxydant sont altérés chez les rats traités uniquement par la métribuzine. En effet, l'exposition à une dose de 133,33 mg/kg de Mtz a provoqué une augmentation de la peroxydation lipidique (augmentation du taux de MDA), une diminution de l'activité de la GPx et une déplétion de la teneur tissulaire en GSH réduit, indiquant que les effets délétères de la Mtz chez les rats sont associés à un stress oxydant au niveau des organes (Chiali et al., 2013).

Rappelons qu'une génération accrue des espèces réactives à l'oxygène (ROS) conduit à une peroxydation lipidique (Niki, 2009). Les niveaux élevés de substances réactives (malondialdéhyde) à l'acide thiobarbiturique (test TBARS) observés chez les rats du groupe Mtz, est le reflet de la présence de lipides ayant subi une peroxydation. En fait, les pesticides sont capables d'agir à ces molécules via des phénomènes oxydatifs liés à la production d'espèces réactives de l'oxygène, conduisant à la libération de différents aldéhydes toxiques comme le malondialdéhyde (MDA), qui représente un bio marqueur de la peroxydation lipidique (Abbassy et al., 2014).

De plus, la baisse du taux de glutathion réduit (GSH) dans les tissus étudiés (foie, reins, cerveau et testicules), peut être considérée comme un mécanisme préventif à l'action de la métribuzine. Cet effet de GSH résulte des processus de conjugaison ou de protection antioxydante, peut permettre d'abaisser la génération d'espèces réactives de l'oxygène induit par la métribuzine ainsi que la production de lipides peroxydés (Chiali et al., 2013).

Concernant le lien existant entre l'activité de la GPx et le glutathion, il semble important de rappeler que la glutathion peroxydase (GPx) est considérée comme une enzyme jouant un rôle important dans la prévention des dommages oxydatifs occasionnés par les ROS (Ezeiruaku et Udenwoke, 2016), et que l'activité de cette enzyme est étroitement dépendante de la biodisponibilité de son substrat, le glutathion (Une et Gupta, 2013). Il existe d'ailleurs une diminution observée dans notre étude au niveau de l'activité GPx et de la quantité de GSH, des organes des rats traités par la métribuzine. Cette similarité nous incite à penser que cette relation "GPx-GSH" pourrait réellement jouer un rôle dans les perturbations observées et être la conséquence de la réduction de l'activité GPx (Sharma et al., 2013).

Au vu de ces observations (inhibition enzymatique, déplétion du glutathion et augmentation de la peroxydation lipidique), il semblerait que les rats soient incapables de mettre en place une réponse au stress induit par la métribuzine comme cela est notamment décrit pour d'autres pesticides (Mossa et al., 2015 ; El-Kholy et al., 2015 ; Ojo et al., 2014). Ainsi, ces perturbations oxydatives ont été observées dans le tissu hépatique et rénal des rats exposés à de faibles doses de fipronil (Mossa et al., 2015), dans le tissu testiculaire des rats traités par l'atrazine (El-Kholy et al., 2015) et dans le tissu cérébral des rats exposés par voie orale au dichlorvos (Ojo et al., 2014).

En traitement préventif, la quercétine et la vanilline ont, par ailleurs, empêché la chute de GSH et l'augmentation des niveaux de MDA. De même, le traitement a amélioré significativement le taux de GPx dans le foie, le rein, le cerveau et le testicule. Nos résultats montrent clairement que la quercétine et la vanilline ont permis de rétablir les perturbations pro-oxydantes induites par la Mtz. Cet effet serait en partie dû à leurs propriétés antioxydantes. Comme tous les autres polyphénols, la quercétine (Ogundajo et al., 2014) et la vanilline (Al Asmari et al., 2016) ont des propriétés antioxydantes très puissantes, permettant de lutter contre la formation de radicaux libres en excès.

Ces derniers résultats ont été histologiquement confirmés. La structure histologique du foie et du rein font remarquer une efficacité préventive de la quercétine et la vanilline contre la toxicité de la métribuzine. Ainsi, la diminution des lésions morphologiques induites par la Mtz pourrait être le signe d'une réparation des hépatocytes et d'un renforcement du parenchyme rénal, suite au traitement par la quercétine et la vanilline.

Enfin, il a également été décrit que ces micronutriments étaient capables de protéger les structures cellulaires des altérations oxydatives et stimulaient l'activité des défenses antioxydantes enzymatiques et non enzymatiques face au stress oxydant induit par les pesticides (Gasmi et al., 2016 ; Vara Prasad et al., 2016 ; Elzoghby et al., 2014 ; Ojo et al., 2014 ; Heikal et al., 2014).

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Conclusion générale et perspectives

L'utilisation exponentielle de substances polluantes par l'homme, leur présence dans l'environnement et leurs effets sur les écosystèmes et les ressources et, à terme, sur la santé humaine, constituent l'un des problèmes les plus préoccupants du XXI^{ème} siècle. Les pesticides, dont la métribuzine, sont un exemple de ces substances et donnent lieu à de nombreuses études. Ainsi, au cours de la dernière décennie, une prise de conscience de l'importance de l'alimentation pour la santé est apparue. De multiples constituants et micronutriments de ces aliments tels que les polyphénols, jouent potentiellement un rôle dans cet effet protecteur. Dans ce contexte, un ensemble d'objectifs à atteindre a été fixé dans ce travail de thèse.

Comme annoncé dans l'introduction du manuscrit, deux objectifs majeurs constituaient notre projet de mémoire : (i) étudier les paramètres toxicologiques (effets biologiques) de la métribuzine (Mtz) chez le rat et (ii) évaluer l'effet protecteur d'une supplémentation en polyphénols (quercétine ou vanilline) sur ces paramètres. Pour cela, nous avons étudié quatre aspects possibles de l'expression de la toxicité de la métribuzine : stress oxydant, hématotoxicité, altérations biochimiques et histologiques.

Après contamination par ingestion d'eau de boisson chez le rongeur, la métribuzine entraîne :

- une baisse des valeurs hématologiques, et en particulier du nombre de globules rouges, du taux d'hémoglobine et d'hématocrite ;
- une augmentation des marqueurs biochimiques d'une atteinte hépatique :
 - élévation du taux sanguin de glucose (hyperglycémie) et de bilirubine ;
 - élévation des triglycérides et du taux de cholestérol (hyperlipidémie) ;
 - élévation des enzymes hépatiques telles que les transaminases Alanine Amino Transférases (ALT) et Aspartate Amino Transférases (AST) ainsi qu'une augmentation de la Phosphatase Alcaline (PAL) ;
- une diminution de la concentration de protéines totales (hypoprotidémie), traduisant ainsi une atteinte hépatique.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

- une augmentation des marqueurs biochimiques d'une insuffisance rénale:
 - Elévation de l'urée et de la créatinine sanguines après 3 semaines de contamination.
- une modification de l'équilibre pro/anti-oxydant se manifestant notamment par une augmentation de la peroxydation lipidique (MDA) et une diminution de l'activité de glutathion peroxydase (GPx) et de la quantité de glutathion (GSH) dans le foie, les reins, le cerveau et les testicules.
- une altération structurale des tissus hépatiques et rénaux, avec une modification des différents paramètres de croissance (poids corporel et poids relatif des organes des rats).

Par ailleurs, nous avons observé de nombreuses variations dans les effets de Mtz après le traitement, avec la quercétine ou la vanilline. L'administration par voie intrapéritonéale de quercétine (50 mg/kg) ou de vanilline (150 mg/kg), a induit un effet protecteur sur divers paramètres physiologiques et marqueurs de stress oxydant.

En conclusion, les résultats de notre recherche apportent un éclairage sur les études faites précédemment, montrant qu'une exposition à de faibles doses de pesticides pouvant provoquer des effets néfastes sur l'organisme. Ainsi, ces travaux ont permis d'affirmer que la quercétine et la vanilline font parties des polyphénols dignes d'intérêt. La quercétine et la vanilline, comme tous les polyphénols, pourraient s'avérer bénéfiques pour la santé.

Au terme de cette étude, il semble approprié pour l'avenir :

1) d'évaluer la toxicité de la métribuzine sur une période plus longue afin de mettre en évidence les effets nocifs après un traitement plus long ;

2) d'étendre l'évaluation des risques potentiels pour la santé à d'autres espèces de mammifères, pour mettre en évidence les éventuels risques potentiels pour la santé qui ne se manifesterait pas chez le rat.

3) d'approfondir l'étude par des techniques plus complètes au niveau moléculaire, pour contribuer à la recherche des corrélations entre les désordres métaboliques et les altérations morphologiques et étudier plus en détails l'histopathologie.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

4) d'étudier les effets neurotoxiques de la métribuzine par le dosage de marqueur enzymatique de neurotoxicité, l'acétylcholinestérase (AChE).

5) de déterminer l'impact de la métribuzine sur la fertilité des rats mâles (concentration, vitalité, mobilité, morphologie et anomalies des spermatozoïdes).

6) de confirmer les actions anti-oxydantes de la quercétine et la vanilline chez l'homme et de préciser les effets hypoglycémiants, hypotriglycéridémiants et hypocholestérolémiants déjà obtenus.

7) d'étudier les possibilités de renforcer l'effet protecteur par l'administration concomitante de la quercétine et la vanilline, suggérant ainsi une possible synergie entre ces deux polyphénols.

RÉFÉRENCES
BIBLIOGRAPHIQUE

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abbassy M.A., Marzouk M.A., Mansour S.A., Shaldam H.A., Mossa A.T.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**: 218.

Abdel Rasoul M.A., Marei G.I.K. (2016). Potential therapeutic effect of turmeric (*Curcuma longa*) against adverse effects of penconazole fungicide to white rats. *International Journal of Pharmacology and Toxicology.* **4** (2): 178-186.

Abdel-Ghany R., Mohammed E., Anis S., Barakat W. (2016). Impact of Exposure to Fenitrothion on Vital Organs in Rats. *Journal of Toxicology.* 18 p.

Abele D., Heise K., Pörtner H.O., Puntarelo S. (2002). Temperature-dependence of mitochondrial function and production of reactive oxygen species in the intertidal mud clam *Mya arenaria*. *J Exp Biol.* 205: 1831-41.

Al Asmari A., Al Shahrani H., Al Masri N., Al Faraidi A., Elfaki I., Arshaduddina M. (2016). Vanillin abrogates ethanol induced gastric injury in rats via modulation of gastric secretion, oxidative stress and inflammation. *Toxicology Reports.* 3 : 105-113.

Al-Attar A.M. (2015). Effect of grapeseed oil on diazinon-induced physiological and histopathological alterations in rats. *Saudi Journal of Biological Sciences.* 22 : 284-292.

Al-Attar A.M., Abu Zeid I.M. (2013). Effect of Tea (*Camellia sinensis*) and Olive (*Olea europaea* L.) Leaves Extracts on Male Mice Exposed to Diazinon. *BioMed Research International.* 6 p.

Alavanja M.C., Hoppin J.A., Kamel F. (2004). Health effects of chronic pesticide and childhood cancer and Neurotoxicity. *Annu Rev Public Health.* 25: 155-197.

Alilou H., Bencharki B., Idrissi Hassani L.M., Barka N. (2014). Screening phytochimique et identification spectroscopique des flavonoïdes d'*Asteriscusgraveolens* subsp. *odorus*. *Afrique SCIENCE.* **10** (3) : 316-328.

Al-Mutairi D.A., Craik J.D., Batinic-Haberle I., Benov L.T. (2007). Induction of oxidative cell damage by photo-treatment with zinc meta N-methylpyridylporphyrin. *Free Radic Res.* **41** (1): 89-96.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Al-Shaabi S.N., Waly M.I., Al-Subhi L., Tageldin M.H., Al-Balushi N.M., Rahman M.S. (2016). Ameliorative Effects of Pomegranate Peel Extract against Dietary-Induced Nonalcoholic Fatty Liver in Rats. *Prev Nutr Food Sci.* **21** (1): 14-23.

Ames B.N., Cathcart R., Schwiers E., Hochstein P. (1981). Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer: a hypothesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **78** (11): 6858-62.

Andrea Rother H. (2014). Communicating pesticide neurotoxicity research findings and risks to decision-makers and the public. *NeuroToxicology.* **45** : 327-337.

Antherieu S., Ledirac N., Luzy A.P., Lenormand P., Caron J.C., Rahmani R. (2007). Endosulfan decreases cell growth and apoptosis in human HaCaT keratinocytes: partial ROS-dependent ERK1/2 mechanism. *J Cell Physiol.* **213**: 177-186.

Anway M.D., Cupp A.S., Uzumcu M., Skinner M.K. (2005). Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male rat fertility. *Science.* **308** (5727): 1466-1469.

Aprioku J.S. (2013). Pharmacology of free radicals and the impact of reactive oxygen species on the testis. *J Reprod Infertil.* **14** (4): 158-172.

Ara B., Shah J.M., Jan R., Muhammad M. (2016). Spectrophotometric determination of metribuzin herbicide with p-dimethylamino-benzaldehyde using factorial designs for optimization of experimental variables. *Journal of Saudi Chemical Society.* **20** : S566-S572.

Arias-Estevez M., Lopez-Periago E., Martinez-Carballo E., Simal-Gandara J., Mejuto J.C., Garcia-Rio L. (2008). The mobility and degradation of pesticides in soils and the pollution of groundwater resources. *Agriculture, Ecosystems and Environment.* **123**: 247-260.

Ashar Waheed M.P., Muthu Mohammed H.S. (2012). Fenvalerate-induced oxidative stress in erythrocytes and the protective role of quercetin. *Int.J.PharmTech Res.* **4**: 1078-1083.

Aubertot J.N., Barbier J.M., Carpentier A., Voltz L.M. (2005). Pesticides, agriculture et environnement. Réduire l'utilisation des pesticides et limiter leurs impacts environnementaux. *Expertise Scientifique Collective INRA/CEMAGREF.* 64 p.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Ayranci E., Numan H. (2004). Studies on removal of metribuzin, bromacil, 2,4-D and atrazine from water by adsorption on high area carbon cloth. *Journal of Hazardous Materials*. **112** : 163-168.

Baconi D.L., Bârcă M., Manda G., Ciobanu A.M., Bălălău C. (2013). Investigation of the toxicity of some organophosphorus pesticides in a repeated dose study in rats. *Rom J Morphol Embryol*. **54** (2): 349-56.

Badgujar P.C., Jain S.K., Singh A., Punia J.S., Gupta R.P., Chandratre G.A. (2013). Immunotoxic effects of imidacloprid following 28 days of oral exposure in BALB/c mice. *Environ Toxicol Pharmacol*. **35** (3): 408-18.

Bagchi D., Bagchi M., Hassoun E.A., Stohs S.J. (1995). In vitro and in vivo generation of reactive oxygen species, DNA damage and lactate dehydrogenase leakage by selected pesticides. *Toxicology*. **104** (1-3): 129-140.

Balaban R.S, Nemoto S., Finkel T. (2005). Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell*. **120** (4): 483-95.

Balasundram N., Sundram K., Samman S. (2006). Phenolic compounds in plants and agriindustrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*. **99** : 191-203.

Baldi I., Filleul L., Mohammed-Brahim B., Fabrigoule C., Dartigues J.F., Schwall S., Drevet J.P., Salamon R., Brochard P. (2001). Neuropsychologic effects of longterm exposure to pesticides: results from the French Phytoner study. *Environ Health Perspect*. **109** (8): 839-844.

Barouki R. (2006). Stress oxydant et vieillissement. *Medecine/sciences*. **22** (3): 266-72.

Baş H., Kalender S., Pandir D. (2014). In vitro effects of quercetin on oxidative stress mediated in human erythrocytes by benzoic acid and citric acid, *Folia Biologica (Kraków)*. **62**: 59-66.

Bayer. (1990). Document de la société BAYER© AG, division phytosanitaire.

Beckman K.B., Ames B.N. (1998). The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev*. **78**: 547-581.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Behrend L., Henderson G., Zwacka R.M. (2003). Reactive oxygen species in oncogenic transformation. *Biochem Soc Trans.* 31: 1441-4.

Belagali Y., Ullal S.D., Shoeb A., Bhagwath V., Ramya K., Maskeri R. (2013). Effect of vanillin on lipid profile in a model of hyperlipidemia, a preliminary study. *Indian J Exp Biol.* 51 (4): 288-91.

Berenzen N., Lentzen-Godding A., Probst M., Schulz H., Schulz R., Liess M. (2005). A comparison of predicted and measured levels of runoff-related pesticide concentrations in small lowland streams on a landscape level. *Chemosphere.* 58 (5): 683-691.

Bérubé V.E., Boily M.H., Deblois C., Dassylva N., Spear P.A. (2005). Plasma retinoid profile in bullfrogs, *Ranacatesbeiana*, in relation to agricultural intensity of sub-watersheds in the Yamaska River drainage basin (Québec, Canada). *Aquatic Toxicology.* 71: 109-120.

Bisbal C., Lambert K., Avignon A. (2010). Antioxidants and glucose metabolism disorders. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 13 (4): 439-46.

Bloomer R.J., Fisher-Wellman K.H. (2008). Blood Oxidative Stress Biomarkers: Influence of Sex, Training Status, and Dietary Intake. *Gend Med.* 5 (3): 218-28.

Bonnefont-Rousselot D. (1994). Irradiation des membranes cellulaires. *J Chim Phys.* 91 : 968-983.

Bonnefont-Rousselot D., Théron P., Beaudeau J.L., Peynet J., Legrand A., Delattre J. (2001). Vieillesse et stress oxydant. Quels marqueurs potentiels ? *Ann. Biol. Clin.* 59 (4) : 453-459.

Bonnefont-Rousselot D., Théron P., Delattre J. (2003). Radicaux libres et anti-oxydants. In : Delattre, J., Durand, G., Jardillier, J.C. *Biochimie pathologique: aspects moléculaires et cellulaires.* Médecine-sciences Flammarion, Paris. 59-81.

Boots A.W., Haenen G.R., Bast A. (2008). Health effects of quercetin: from antioxidant to nutraceutical. *Eur J Pharmacol.* 585 (2-3): 325-37.

Borek C. (1997). Antioxidants and cancer. *Sci Med (Phila).* 4: 51-62.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Bouayed J. (2010). Polyphenols: a potential new strategy for the prevention and treatment of anxiety and depression. *Curr Nutr Food Sci.* 6 : 13-18.

Boulton D.W., Walle U.K., Walle T. (1998). Extensive binding of the bioflavonoid quercetin to human plasma proteins. *J Pharm Pharmacol.* 50: 243-249.

Bouthin B., Hirtzlin J., Schmitt E. La Vanilline : dualité synthétique – naturel. (2005). Article édité en ligne (http://www.prepa-cpe.fr/documents/La_vanilline.pdf).

Boveris A., Oshino N., Chance B. (1972). The cellular production of hydrogen peroxide. *Biochem J.* 128: 617-630.

Bradford M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantities of microgram quantities of protein utilizing the principle of proteinbinding, *Anal. Biochem.* 72 : 248-254.

Bravo L. (1998). Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr Rev.* 56 (11): 317-33.

Brigelius-Flohe R., Traber M.G. (1999). Vitamin E: function and metabolism. *FASEB J.* 13 (10): 1145-55.

Browne R.W., Bloom M.S., Schisterman E.F., Hovey K., Trevisan M., Wu C., Liu A., Wactawski Wende J. (2008). Analytical and biological variation of biomarkers of oxidative stress during the menstrual cycle. *Biomarkers.* 13 (2): 160-83.

Brun J., Khaled S., Raynaud E., Bouix D., Micallef J., Orsetti A. (1998). The triphasic effects of exercise on blood rheology: Which relevance to physiology and pathophysiology?. *Clinical Hemorheology and Microcirculation.* 19 (2) : 89-104.

Bruneton J. (1993). *Pharmacognosie. Technique et documentation-Lavoisier, Paris.* p 278.

Bruneton J. (1999). *Phytochimie. Plantes medicinales. Pharmacognosie. 3^{ème} édition, Paris,*

Bureau G., Longpre F., Martinoli M.G. (2008). Resveratrol and quercetin, two natural polyphenols, reduce apoptotic neuronal cell death induced by neuroinflammation. *J Neurosci Res.* 86 (2): 403-10.

Burtis A. et al. (1999). *Tietz textbook of clinical chemistry. 3rd Ed AACC.*

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Calvet R. (2005). Les pesticides dans le sol : conséquences agronomiques et environnementales. Référence scientifique. Editions France Agricole. 641 p.

Calvet R., Barriuso E., Benoit P., Bedos C., Charnay M.P., Coquet Y. (2005). Les pesticides dans le sol. Conséquences agronomiques et environnementales. Editions France Agricole, Paris. 637 p.

Calviello G., Piccioni E., Boninsegna A., Tedesco B., Maggiano N., Serini S., Wolf F.I., Palozza P. (2006). DNA damage and apoptosis induction by the pesticide Mancozeb in rat cells: involvement of the oxidative mechanism. *Toxicol Appl Pharmacol.* **211** (2): 87-96.

Calviello G., Piccioni E., Boninsegna A., Tedesco B., Maggiano N., Serini S., Wolf F. I., Palozza, P. (2006). DNA damage and apoptosis induction by the pesticide Mancozeb in rat cells: involvement of the oxidative mechanism. *Toxicol Appl Pharmacol.* **211** (2) : 87-96.

Cano N., Barnoud D., Schneider S.M., Vasson M.P., Hasselmann M., Leverve X. (2006). Traité de nutrition artificielle de l'adulte. Edition Springer. p 255.

Carr A.C., Zhu B.Z., Frei B. (2000). Potential antiatherogenic mechanisms of ascorbate (vitamin C) and alpha-tocopherol (vitamin E). *Circ Res.* **7** (5) : 349-354.

Carriere A., Galinier A., Fernandez Y., Carmona M.C., Pénicaud L., Casteilla L. (2006). Physiological and physiopathological consequences of mitochondrial reactive oxygen species. *Med Sci (Paris).* **22** (1): 47-53.

Cash T., Pan Y., Simon M.C. (2007). Reactive oxygen species and cellular oxygen sensing. *Free Radic Biol Med.* **43** (9): 1219-25.

Chaturvedi M., Sharma C., Chaturvedi M. (2013). Effects of Pesticides on Human Beings and Farm Animals: A Case Study. *Res. J. Chem. Env. Sci.* **1** (3) : 14-19.

Chiali F.Z., Merzouk H., Merzouk S.A., Medjdoub A., Narce M. (2013). Chronic low level metribuzin exposure induces metabolic alterations in rats. *Pesticide Biochemistry and Physiology.* **106** (1-2): 38-44.

Christelle B., Eduardo Bde O., Latifa C., Elaine-Rose M., Bernard M., Evelyne R.H., Mohamed G., Jean-Marc E., Catherine H. (2011). Combined docking and molecular

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

dynamics simulations to enlighten the capacity of *Pseudomonas cepacia* and *Candida antarctica* lipases to catalyze quercetin acetylation. *J Biotechnol.* **156** (3): 203-10.

Comhair S.A.A., Erzurum S.C. (2002). Antioxidant responses to oxidant-mediated lung diseases. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* **283** (2): 246-55.

Comité Permanent de l'Environnement et du Développement Durable. (2000). Les pesticides, un choix judicieux s'impose pour protéger la santé et l'environnement, [En ligne]. Adresse URL : <http://cmte.par1.gc.ca/Content/H OC/ committee/362/ envi/reports/rp 103 1697/ envi 01 /04-toc-f. html>.

CPP. (2002). Risques sanitaires liés à l'utilisation des produits phytosanitaires. Comité de la Prévention et de la Protection. 47 p.

CRAAQ. (2005). Centre de Référence en Agriculture et Agroalimentaire du Québec. Guide de référence en fertilisation. 1^{ière} édition. Première mise à jour (Avril 2005). Ed. C.R.A.A.Q, Sainte-Foy. 294 p.

Crespy V., Morand C., Besson C., Manach C., Démigné C., Rémésy C. (2001). Comparison of the intestinal absorption of quercetin, phloretin and their glucosides in rats. *J Nutr.* **131** (8): 2109-14.

Crespy V., Morand C., Manach C., Besson C., Démigné C., Rémésy C. (1999). Part of quercetin absorbed in the small intestine is conjugated and further secreted in the lumen. *Am J Physiol.* **277** : G120-G126.

Crespy, V., Morand C., Besson C., Cotellet N., Vézin H., Demigné C., Rémésy C. (2003). The splanchnic metabolism of flavonoids highly differed according to the nature of the compound. *Am J Physiol.* **284** (6): G980- 988.

Curtay J.P, Robin J.M. (2000). Intérêt des complexes antioxydants. *Nutrithérapie Info.* 1-4.

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

Dalle-Donne I., Rossi R., Colombo R., Giustarini D., Milzani A. (2006). Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clin Chem.* **52** (4): 601-23.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Dangles O.** (2006). Les polyphénols en agroalimentaire. Lavoisier. 29-50.
- Dangles O.** (2012). Antioxidant activity of plant phenols: chemical mechanisms and biological significance. *Current Organic Chemistry*. 16 : 692-714.
- Dangles O., Dufour C.** (2008). Flavonoid-protein binding processes and their potential impact on human health. In : *Recent Advances in Polyphenol Research*. Blackwell Publishing: Oxford. 01: 67-87.
- Dangles O., Dufour C., Bret S.** (1999). Flavonol-serum albumin complexation. Two electron oxidation of flavonols and their complexes with serum albumin. *J Chem Soc, Perkin Trans II*. 4 : 737-744.
- D'Archivio M., Filesi C., Di Benedetto R., Gargiulo R., Giovannini C., Masella R.** (2007). Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Ann Ist Super Sanita*. **43** (4): 348-61.
- Das P.P., Shaik A.P., Jamil K.** (2007). Genotoxicity induced by pesticide mixtures: invitro studies on human peripheral blood lymphocytes. *Toxicol Ind Health*. **23** (8) : 449- 458.
- Daum-Badouard, C.** (2006). Les lésions des acides nucléiques: détection par CLHP-SM/SM dans les milieux biologiques humains et intérêt comme biomarqueurs du stress oxydant et de l'inflammation. Université JOSEPH FOURIER GRENOBLE. France. p 228.
- Davis D.G., Olson P.A., Swanson H.R., Frear D.S.** (1991). Metabolism of the herbicide metribuzin by an N-glucosyltransferase from tomato cell cultures. *Plant Science*. **74** : 73-80.
- De Backer D.** (2006). Inhibition du monoxyde d'azote dans le choc septique Nitric oxide inhibition in septic shock. *Réanimation*. **15** (2): 145-149.
- De D.C., Baudhuin P.** (1966). Peroxisomes (microbodies and related particles). *Physiol Rev*. **46** (2): 323-57.
- De Leiris J.** (2003). Biochemistry of free radicals. *Heart Metab*. 19: 40-44.
- De Oliveira C.R, Ceolin J., De Oliveira R.R., Schemitt E.G., Colares J.R., Bauermann L.D.F., Costabeber I.H., Morgan-Martins M.I., Mauriz J.L., Silva J.D., Reyes J.M., Marroni N.P.** (2014). Effects of quercetin on polychlorinated biphenyls-induced liver injury in rats. *Nutr Hosp*. 29 : 1141-1148.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Defraigne J.O., Pincemail J. (2008). Stress oxydant et antioxydants : mythes et réalités. *Rev Med Liège*. 63: 10-19.

Deka C., Dutta K. (2015). Effect of cypermethrin on blood glucose and urea levels of *Heteropneustes fossilis* (Bloch). *Biolife*. 3 (3) : 717-721.

Delattre J., Beaudoux J.L., Bonnefont-Rousselot D. (2005). Radicaux libres et stress oxydant: Aspects biologiques et pathologiques (broché). *L'actualité Chimique*. 108-115.

Demur C., Métais B., Canlet C., Tremblay-Franco M., Gautier R., Blas-Y-Estrada F., Sommer C., Gamet-Payraastre L. (2013). Dietary exposure to a low dose of pesticides alone or as a mixture: The biological metabolic fingerprint and impact on hematopoiesis. *Toxicology*. 308: 74-87.

Densiov E.T., Afanas'ev I.B. (2005). IN: Oxidation and antioxidants in organic chemistry and biology. Eds: Taylor & Francis Group (U.S.A). 703-861.

Dhanalakshmi C., Manivasagam T., Nataraj J., Thenmozhi A.J., Essa M.M. (2015). Neurosupportive role of vanillin, a natural phenolic compound, on rotenone induced neurotoxicity in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. p 11.

Dignum M.J.W., Kerler J., Verpoorte R. (2002). Vanilla curing under laboratory conditions. *Food Chemistry*. 79 (2) : 165-171.

Dikalov S., Griendling K.K., Harrison D.G. (2007). Measurement of reactive oxygen species in cardiovascular studies. *Hypertension*. 49 (4): 717-27.

Dorval J., Leblond V., Deblois C., Hontela A. (2005). Oxidative stress and endocrine endpoints in white sucker (*Catostomus commersoni*) from a river impacted by agricultural chemicals. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 24 (5): 1273-1280.

Dorvault F. (1995). *L'officine ou répertoire général de pharmacie pratique*. 23^{ème} Edition Vigot.

Drechsel D.A., Patel M. (2008). Role of reactive oxygen species in the neurotoxicity of environmental agents implicated in Parkinson's disease. *Free Radical Biology and Medicine*. 44 (11): 1873-1886.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Droge W.** (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* **82** (1): 47-95.
- Druzynka B., Stepniewska A., Wolosiak R.** (2007). The influence of time and type of solvent on efficiency of the extraction of polyphenols from green tea and antioxidant properties obtained extracts. *Acta Sci. Pol., Technol. Aliment.* **6** (1). 27-36.
- Dufresne C.** (2000). Encyclopédie de sécurité et de santé au travail, Organisation internationale du travail. 1: 11-18.
- Dugas A.J.J.R, Castañeda-Acosta J., Bonin G.C., Price K.L., Fischer N.H., Winston G.W.** (2000). Evaluation of the total peroxy radical-scavenging capacity of flavonoids: Structure-activity relationships. *J Nat Prod.* **63** (3) : 327-31.
- Durackova Z., Djrolo F., Hougbe H., Avode G., Attoulou V., Addra B., Kodjoh N., Avimadj M.** (2008). Oxidants, Antioxidants and Oxidative stress. *Mitochondrial medicine.* 19-43.
- Dutta A.L., Sahu C.R.** (2013). *Embllica officinalis* Garten fruits extract ameliorates reproductive injury and oxidative testicular toxicity induced by chlorpyrifos in male rats. *SpringerPlus.* 2:541.
- 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. *J Toxicol Environ Health Sci.* **6** (10): 194-202.
- Dziąło M., Mierziak J., Korzun U., Preisner M., Szopa J., Kulma A.** (2016). The Potential of Plant Phenolics in Prevention and Therapy of Skin Disorders. *Int. J. Mol. Sci.* **17** (2): 160.
- Dziedzic S.Z., Hudson B.J.F.** (1983). Polyhydroxy chalcones and flavanones as antioxidants for edible oils. *Food Chemistry.* 12: 205-212.
- Dziezak J.D.** (1986). Preservatives: Antioxidants. *Food Technol.* 40: 94-102.
- Eason C., O'Halloran K.** (2002). Biomarkers in toxicology versus ecological risk assessment. *Toxicology.* **181** (182): 517-21.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Egert S., Bosy-Westphal A., Seiberl J., Kürbitz C., Settler U., Plachta-Danielzik S., Wagner A.E., Frank J., Schrezenmeir J., Rimbach G., Wolfram S., Müller M.J. (2009). Quercetin reduces systolic blood pressure and plasma oxidised low-density lipoprotein concentrations in overweight subjects with a high-cardiovascular disease risk phenotype: a double-blinded, placebo-controlled cross-over study. *British Journal of Nutrition*. 102: 1065-1074.

El Gharras H. (2009). Polyphenols: Food sources, properties and applications - A review. *International Journal of Food Science and Technology*. **44** (12): 2512-2518.

El-Demerdash F.M., Nasr H.M. (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.

El-Kholy W.M., Hemieda F.A.E., El-Zarif N.A. (2015). Protective effect of aqueous extract of *Anacyclus pyrethrum* root on atrazine-induced male reproductive disorders in rats. *International Journal of Advanced Research*. **3** (10) : 1701-1715.

Elzoghby R.R., Hamuoda A.F., 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): 177-88.

EPA. (2003). Environmental Protection Agency. Health effects support document for metribuzin.

Esterbauer H., Gebicki J., Puhl H., Jungens G. (1992). The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radic. Biol. Med.* 13 : 341.

Ezeiruaku F.C., Udenwoke I.O. (2016). Evaluation of plasma glutathione peroxidase (GPX) enzyme in type 1 and type 2 chronic diabetes mellitus patients in Yenegoa, Bayelsa State of Nigeria. *Int. Res. Med. Sci.* **4** (3) : 050-054.

Fang Y.Z., Yang S., Wu G. (2002). Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*. **18** (10): 872-9.

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

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Felgines C., Texier O., Garcin P., Besson C., Lamaison J.L., Scalbert A.** (2009). Tissue distribution of anthocyanins in rats fed a blackberry anthocyanin-enriched diet. *Mol Nutr Food Res.* **53** (9) : 1098-1103.
- Feriani A., Hachani R., Kaabi B., Ncir M., El Feki A., Allagui M.S.** (2016). Protective effects of *Zygophyllum album* extract against deltamethrin-induced hyperglycemia and hepato-pancreatic disorders in rats. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology.* **94** (11) : 1202-1210.
- Finaud J., Lac G., Filaire E.** (2006). Oxidative Stress. Relationship with Exercise and Training. *Sports med.* **36** (4): 327-358.
- Flohe L., Gunzler W.A.** (1984). Analysis of glutathione peroxidase, *Methods Enzymol.* **105** : 114-121.
- Flora S.J, Mittal M., Mehta A.** (2008). Heavy metal induced oxidative stress & its possible reversal by chelation therapy. *Indian J. Med Res.* **128** (4):501-23.
- Folkes L.K., Wardman P.** (2004). Kinetics of the reaction between nitric oxide and glutathione: implications for thiol depletion in cells. *Free Rad Biol Med.* **37** : 549-556 .
- Formica J.V., Regelson W.** (1995). Review of the biology of Quercetin and related bioflavonoids. *Food Chem Toxicol.* **33**: 1061-1080.
- Fortier J.C., Messier C.** (2005). Revue en science de l'environnement *Vertigo.* Vol 6 no 2 (Canada). France. 125-165.
- Freeman B.A., Young S.L., Crapo J.D.** (1983). Liposome-mediated augmentation of superoxide dismutase in endothelial cells prevents oxygen injury. *J Biol Chem.* **258** (20): 12534-42.
- Freinbichler W., Colivicchi M.A., Stefanini C., Bianchi L., Ballini C., Misini B., Weinberger P., Linert W., Varešlija D., Tipton K.F., Della Corte L.** (2011). Highly reactive oxygen species: detection, formation, and possible functions. *Cell Mol Life Sci.* **68** (12): 2067-79.
- Fukumoto L.R., Mazza G.** (2000). Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *J Agric Food Chem.* **48** (8): 3597-604.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Galal M.K., Khalaf A.A., Ogaly H.A., Ibrahim M.A. (2014). Vitamin E attenuates neurotoxicity induced by deltamethrin in rats. *BMC Complement Altern Med.* **2** (14): 458.

Gang D.R., Kasahara H., Xia Z.Q., Vander Mijnsbrugge K., Bauw G., Boerjan W., Van Montagu M., Davin L.B., Lewis N.G. (1999). Evolution of plant defense mechanisms. Relationships of phenylcoumaran benzylic ether reductases to pinoretinol-lariciresinol and isoflavone reductases. *J Biol Chem.* **274** (11): 7516-27.

Ganther H.E. (1999). Selenium metabolism, selenoproteins and mechanisms of cancer prevention: Complexities with thioredoxin reductase. *Carcinogenesis.* **20** (9): 1657-66.

Garrel C., Ceballos-Picot I., Germain G., Al-Gubory K.H. (2007). Oxidative stress-inducible antioxidant adaptive response during prostaglandin F₂α-induced luteal cell death in vivo. *Free Radic Res.* **41** (3): 251-9.

Gasmi S., Rouabhi R., Kebieche M., Salmi A., Boussekine S., Toualbia N., Taib C., Henine S., Bouteraa Z., Djabri B. (2016). Neurotoxicity of Acetamiprid in Male Albino Rats and the Opposite Effect of Quercetin. *Biotechnol Ind J.* **12** (7) : 113.

Gate L., Paul J., Nguyen B., Tew K.D., Tapiero H. (1999). Oxidative stress induced in pathologies: the role of antioxidants. *Biomed and Pharmacother.* **53** : 169-180.

Gautier A., Legallais C. (2009). Les dispositifs de suppléance hépatique Liver support systems. *Réanimation.* **18** : 413-419.

Gee J.M., DuPont M.S., Day A.J., Plumb G.W., Williamson G., Johnson I.T. (2000). Intestinal transport of quercetin glycosides in rats involves both deglycosylation and interaction with the hexose transport pathway. *J Nutr.* **130** (11): 2765-71.

Gendron A., Branchaud A. (1997). Impact potentiel de la contamination du milieu aquatique sur la reproduction du sucré cuivré (*Moxostomahubbsi*) : synthèse des connaissances. Ministère de l'Environnement et de la Faune, Service de l'aménagement et de l'exploitation de la faune, Direction régionale de la Montérégie (France). Rapport technique. 16-02.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Gérin M., Gosselin P., Cordier S., Viau C., Quénel P., Dewailly E. (2003). Environnement et santé publique - Fondements et pratiques. Edisem Inc. / Editions Tec & Doc, Acton Vale / Paris.

Ghouleh I.A., Khoo N.K.H., Knaus U.G., Griendling K.K., Touyz R.M., Thannickal V.J., Barchowsky A., Nauseef W.M., Kelley E.E., Bauer P.M., Darley-Usmar V., Shiva S., Cifuentes-Pagano E., Freeman B.A., Gladwin M.T., Pagano P.J. (2011). Oxidases and Peroxidases in Cardiovascular and Lung Disease: New Concepts in Reactive Oxygen Species Signaling. *Free Radic Biol Med.* **51** (7): 1271-88.

Gildemeister E., Hoffmann F.R. (1899). Die Ätherischen Öle. 3rd edn, volume III. Julius Springer, Schimmel & Co., Leipzig, Berlin. p 288.

Goldstein S., Meyerstein D., Czapski G. (1993). The Fenton reagents. *Free Rad Biol Med.* **15**: 435-45.

Gome M.B., Kouakou K., Toure A., Traore F. (2011). Étude de la toxicité aiguë et subchronique de l'extrait aqueux de *Passiflora foetida* Linn. (Passifloraceae) chez les rats et les souris. *Int. J. Biol. Chem. Sci.* **5** (5): 1777-1789.

Gomes I.B., Porto M.L., Santos M.C.L., Campagnaro B.P., Pereira T.M., Meyrelles S.S., Vasquez E.C. (2014). Renoprotective, anti-oxidative and anti-apoptotic effects of oral low-dose quercetin in the C57BL/6J model of diabetic nephropathy. *Lipids in Health and Disease.* **13**: 184.

Gordon M.H. (1996). Dietary antioxidants in disease prevention. *Natural Product Reports.* **13** (4): 265-273.

Goto M., Ueda K., Hashimoto T., Fujiwara S., Matsuyama K., Kometani T., Kanazawa K. (2008). A formation mechanism for 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine mediated by peroxidized 2' deoxythymidine. *Free Radic Biol Med.* **45** (9):1318-25.

Green R.M., Flamm S. (2002). AGA Technical review on the evaluation of liver chemistry tests. *Gastroenterology.* **123**: 1367-84.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Gregory T.R., Wood C.M. (2010). The effects of chronic plasma cortisol elevation on the feeding behaviour, growth, competitive ability, and swimming performance of juvenile rainbow trout. *Physiol. Biochem. Zool.* **72** (3) : 286-295.

Guetteridge J.M. (1993). Free radicals in disease processes: a complication of cause and consequence. *Free Radic Res Commun.* **19** (3): 141-58.

Habtemariam S. (2003). Cytotoxic and cytostatic activity of erlangerins from *Commiphora erlangeriana*. *Toxicon.* **41** (6) : 723-7.

Halliwell B. (1994). Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutr Rev.* **52** : 253-65.

Halliwell B. (1996). Antioxidants in human health and disease. *Annu Rev Nutr.* **16**: 33-50.

Halliwell B. (2006). Phagocyte-derived reactive species: salvation or suicide. *Trends Biochem Sci.* **31** (9): 509-15.

Halliwell B., Gutteridge J. (1992). Biologically relevant metal ion-dependent hydroxyl radical generation An update. *FEBS Letters.* **307** (1): 108-112.

Halliwell B., Cross C.E. (1994). Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. *Environ Health Perspect.* **102** Suppl 10: 5-12.

Halliwell B., Gutteridge J.M.C. (1996). Mechanisms involved in the generation of free radicals. *Pathologie Biologie.* **44**: 6-13.

Halliwell B., J.M.C. Gutteridge. (2008). *Free Radicals in Biology and Medicine.* 4th edition. Oxford: Oxford University Press. 160-166.

Halliwell B., Whiteman M. (2004). Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?. *Br J Pharmacol.* **142** (2): 231-55.

Harmatha J., Zidek Z., Kmoníčková E., Šmidrkal J. (2011). Immunobiological properties of selected natural and chemically modified phenylpropanoids. *Interdisc Toxicol.* **4** (1): 5-10.

Harwood M., Danielewska-Nikiel B., Borzelleca J.F., Flamm G.W., Williams G.M., Lines T.C. (2007). A critical review of the data related to the safety of quercetin and lack of

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

evidence of in vivo toxicity, including lack of genotoxic/carcinogenic properties. *Food Chem Toxicol.* **45** (11): 2179-2205.

Hashish E.A., Elgaml S.A. (2016). Role of nicotinic acid in mitigating methomyl induced acute toxicity in albino rats. *J Clin Exp Pathol.* **6**: 268.

Havkin-Frenkel D., Belanger F.C. (2011). *Handbook of vanilla science and technology* (Ed.)^ (Eds.). Wiley-Blackwell, Chichester (UK). p 360.

Havsteen B.H. (2002). The biochemistry and medical significance of flavonoids. *Pharmacol Ther.* **96** (2-3): 67-202.

He Z., Xia W., Chen J. (2008). Isolation and structure elucidation of phenolic compounds in Chinese olive (*Cnarium album* L.) fruit. *Eur Food Res Technol.* **226** (5): 1191-1196.

Heijnen C.G., Haenen G.R., Van Acker F.A., Van der Vijgh W.J., Bast A. (2001). Flavonoids as peroxynitrite scavengers: the role of the hydroxyl groups. *Toxicol In Vitro.* **15** (1): 3-6.

Heikal T.M., Mossa A.T.H., Ibrahim A.W., Abdel-Hamid H.F. (2014). Oxidative Damage and Reproductive Toxicity Associated with Cyromazine and Chlorpyrifos in Male Rats: The Protective Effects of Green Tea Extract. *Research Journal of Environmental Toxicology.* **8**: 53-67.

Heim E.K., Tagliaferro A.R., Bobilya D.J. (2002). Flavonoid antioxidants : chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J Nutr Biochem.* **13** (10): 572-584.

Hendrich A.B. (2006). Flavonoid-membrane interactions : possible consequence for biological effects of some polyphenolic compounds. *Acta pharmacologica Sinica.* **27**: 27-40.

Henneberg R., Otuki M.F., Ferreira Furman A.E., Hermann P., Do Nascimento A.J., Soares Leonart M.S. (2013). Protective effect of flavonoids against reactive oxygen species production in sickle cell anemia patients treated with hydroxyurea. *Rev Bras Hematol Hemoter.* **35**: 52-5

Héritier F.L., Marques M., Fauteux M., Gaudreau L. (2014). Defining Molecular Sensors to Assess Long-Term Effects of Pesticides on Carcinogenesis. *Int J Mol Sci.* **15** (9): 17148-17161.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Hochberg M., Kohen R., Enk C.D. (2006). Role of antioxidants in prevention of pyrimidine dimer formation in UVB irradiated human HaCaT keratinocytes. *Biomed Pharmacother.* **60** (5): 233-7.

Hollman P.C., Cassidy A., Comte B., Heinonen M., Richelle M., Richling E., Serafini M., Scalbert A., Sies H., Vidry S. (2011). The biological relevance of direct antioxidant effects of polyphenols for cardiovascular health in humans is not established. *J Nutr.* **141** (5): 989S-1009S.

Hollman P.C., Van Trijp J.M., Mengelers M.J., De Vries J.H., Katan M.B. (1997). Bioavailability of the dietary antioxidant flavonol quercetin in man. *Cancer Lett.* **114** (1-2): 139-40.

Hollman P.C.H., Arts C.W. (2000). Flavonols, flavones and flavanols - nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the science of food and agriculture.* **80** : 1081-1093.

Houlot R. (1984). *Techniques d'histopathologie et de cytopathologie.* Ed. Maloine. 19-21 : 225-227.

Houngbèmè A.G, Habib M.Y.G., Medegan S., Yèhouénou B., Bambola B., Gandonou C., Gbaguidi F.A. (2015). Antimicrobial activity of compounds from *Acanthospermum hispidum* DC and *Caesalpinia bonduc* (L.) ROXB: Beninese plants used by healers against HIV-associated microbial infections. *J App Pharm Sci.* **5** (8): 073-081.

Huertas-Pérez J.F., del Olmo Iruela M., García-Campaña A.M., González-Casado A., Sánchez-Navarro A. (2006). Determination of the herbicide metribuzin and its major conversion products in soil by micellar electrokinetic chromatography. *Chromatography A.* **1102** : 280-286.

Hulbertl A.J. (2005). On the importance of fatty acid composition of membranes for aging. *J Theor Biol.* **234** (2): 277-88.

Ibrahim Elsayed A.S., Hegazi M.A., Mostafa H.A.E., Hegazi M.M. (2015). The protective and ameliorative effect of green tea extract on antioxidant status of brain tissue exposed to oxidative stress. *Pyrex Journal of Biomedical Research.* **1** (5) : 059-067.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Ikpesu T.O. (2015). Effects of agro-chemicals on fishes: With reference to changes in circulating biochemical parameters in *Clarias gariepinus* induced with Paraquat dichloride. *Progress in Biological Sciences*. **5** (1) : 111-120.

Irchhaiya R., Kumar A., yadav A., Gupta N., Kumar S., Gupta N., Kumar S., Yadav V., Prakash A., Gurjar H. (2104). Metabolites in plants and its classification. *World journal of pharmacy and pharmaceutical sciences*. **4** (1) : 287-305.

Islas-Flores H., Gómez-Oliván L.M., Galar-Martínez M., Colín-Cruz A., NeriCruz N., García-Medina S. (2013). Diclofenac-induced oxidative stress in brain, liver, gill and blood of common carp (*Cyprinus carpio*). *Ecotoxicol. environ*. **92**: 32-38.

Jamal F., Haque Q.S., Singh S., Arshad M.D. (2016). The Influence of Pesticides on Hepatic and Renal Functions in Occupational Sprayers of Rural Malihabad, Lucknow (India). *Toxicol open access*. **1**: 106.

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

Jenkins A.J., Hill M.A., Rowley K.G. (2007). Diabetes and Oxidant Stress. A New Perspective. Holtzman J.L (ed), *Atherosclerosis and Oxidant Stress*. 123-160.

Jestadi D.B., Phaniendra A., Babji U., Srinu T., Shanmuganathan B., Periyasamy L. (2014). Effects of Short Term Exposure of Atrazine on the Liver and Kidney of Normal and Diabetic Rats. *Journal of Toxicology*. **7** p.

Joshi U.J, Gadge A.S., D'Mello P., Sinha R., Srivastava S., Govil G. (2011). Anti inflammatory, antioxydant and entcancer activity of quercetin and its analogues. *Int J Research Pharm Biomed Sci*. **2** (4): 1756-66.

Jovanovic S.V., Steenken S., Tosic M., Marjanovic B., Simic M.G. (1994). Flavonoids as antioxidants. *J. Am. Chem. Soc*. **116** (11): 4846-4851.

Jyothi B., Narayan G. (1999). Certain pesticide-induced carbohydrate metabolic disorders in the serum of freshwater fish *Clarias batrachus* (Linn.). *Food Chem. Toxicol*. **37** : 417-421.

Kamal-Eldin A., Appelqvist L.A. (1996). The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids*. **31** : 671-701.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Kamat J.P., Ghosh A., Devasagayam T.P.A.** (2000). Vanillin as an antioxidant in rat liver mitochondria: Inhibition of protein oxidation and lipid peroxidation induced by photosensitization. *Mol Cell Biochem.* **209** (1-2): 47-53.
- Kaplan A.** (1984). Glucose. *Clin. Chem.* Toronto. Princeton. 1032-1036.
- Kaplan A.** (1984). Urea. Kaplan A et al .*Clin chem.* The C.V. mosby Co. Si louis.Tronto. Princeton. 1257-1260.
- Kaplan A. et al.** (1984). Bilirubin. *Clin Chem.* The C.V. mosby Co. Si louis.Tronto. Princeton. 1238-1241.
- Kaplan A. et al.** (1984). Triglycerides. *Clin. Chem.* Toronto. Princeton. 437.
- Karakaya S.** (2004). Bioavailability of phenolic compounds. *Crit Rev Food Sci. Nutr.* **44** (6) : 453-64.
- Ket Li H., Chong P.P., Yazan L.S., Ismail M.** (2012). Vanillin Differentially Affects Azoxymethane-Injected Rat Colon Carcinogenesis and Gene Expression. *J Med Food.* **15** (12) : 1096-1102.
- Ket li H., Yazan L.S., Ismail N., Ismail M.** (2011) Toxicology study of vanillin on rats via oral and intra-peritoneal administration. *Food Chem Toxicol.* **49** (1) : 25-30.
- Khedr Nassar A.M.** (2016). Comparative endocrine disrupting effects of abamectin and indoxacarb insecticides. *International Journal of Pharmacology and Toxicology.* **4** (1) : 89-92.
- Kim D.W., Jeong H.J., Kang H.W., Shin M.J., Sohn E.J., Kim M.J., Ahn E.H., An J.J., Jang S.H., Yoo K.Y., Won M.H., Kang T.C., Hwang I.K., Kwon O.S., Cho S.W., Park J., Eum W.S., Choi S.Y.** (2009). Transduced human PEP-1–catalase fusion protein attenuates ischemic neuronal damage. *Free Radic Biol Med.* **47** (7): 941-952.
- Kim J.H., Kang M.J., Choi H.N., Jeong S.M., Lee Y.M., Kim J.I.** (2011). Quercetin attenuates fasting and postprandial hyperglycemia in animal models of diabetes mellitus. *Nutr Res Pract.* **5** (2): 107-11.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Kim S.J., Cho A.R., Han J. (2013). Antioxidant and antimicrobial activities of leafy green vegetable extracts and their applications to meat product preservation. *Food Cont.* **29** (1): 112-120.

Kirschvink N., De Moffarts B., Lekeux P. (2008). The oxidant/antioxidant equilibrium in horses. *The Veterinary Journal.* **177**: 178-191.

Kitous O., Cheikh A., Lounici H., Grib H., Pauss A., Mameri N. (2009). Application of the electrosorption technique to remove Metribuzin pesticide. *J. Hazard. Mater.* **161** : 1035-1039.

Knežević S.V., Blazekwic B., Stefan M.B., Babac M. (2012). Plant polyphenols as antioxidants influencing the human health. In : *Phytochemicals as nutraceuticals-global approaches to their role in nutrition and health.* Edition Venketeshwer Rao. 155-180.

Kochetova M.V, ESeменistaya E.N, Larionov O.G, Revina A.A. (2007). Determination of biologically active phenols and polyphenols in various objects by chromatographic techniques. *Russian Chemical Reviews.* **76** (1): 79-90.

Koller A. (1984). Total serum protein. *Clin. Chem. Toronto. Princeton.* 1316-1324.

Kregel K.C., Zhang H.J. (2007). An integrated view of oxidative stress in aging: basic mechanisms, functional effects, and pathological considerations. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* **292** (1): R18-36.

Krishnappa P., Venkatarangaiah K., Venkatesh, Shivamogga Rajanna S.K., Prakash Gupta R.K. (2014). Antioxidant and prophylactic effects of *Delonix elata* L., stem bark extracts, and flavonoid isolated quercetin against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats. *BioMed Research International.* 14 p.

Krishnasree V., Andallu B. (2013). Radical scavenging activity of vanilla (*Vanilla fragrans*) pods and commercial vanilla essence. *IJSRP.* 3 (11).

Krogholm K.S., Bredsdorff L., Knuthsen P., Haraldsdóttir J., Rasmussen S.E. (2010). Relative bioavailability of the flavonoids quercetin, hesperetin and naringenin given simultaneously through diet. *Eur J Clin Nutr.* **64** (4) : 432-435.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Kumar A., Bhaskar A., Chandra S., Sasmal D., Mukhopadhyay K., Sharma N.** (2015). Mechanism of Deltamethrin induced Immunotoxicity: Current and Future Perspectives. *Receptors & Clinical Investigation*. 2 : 1-7.
- Kumar R., Sharma P.K., Mishra P.S.** (2012). A Review on the Vanillin derivatives showing various biological activities. *Int.J.PharmTech Res.* 4 (1) : 266-279.
- Kundu J.K., Surh Y.** (2008). Cancer chemopreventive and therapeutic potential of resveratrol: Mechanistic perspectives. *Cancer Letters*. 269 (2): 243-261.
- Kyle J.A.M., Duthie G.G.** (2006). Flavonoids in foods. In : *Flavonoids : chemistry, biochemistry and applications*. Andersen, O. M. & Markham, K. R. (eds.), CRC Press, Boca Raton, Florida. 443-469.
- Lagrost L., Masson D., Chapman J.** (2004). Lipoprotéines et métabolisme lipidique. *L'athérosclérose : Physiopathologie, diagnostics, thérapeutiques*. 59-77.
- Laight D.W., Carrier M.J., Anggards E.E.** (2000). Antioxidants, diabetes and endothelial dysfunction. *Cardiovasc Res.* 47 (3): 457-464.
- Lake B.G., Price R.J., Osimitz T.G.** (2015). Mode of action analysis for pesticide-induced rodent liver tumours involving activation of the constitutive androstane receptor: relevance to human cancer risk. *Pest Manag Sci.* 71 (6): 829-34.
- Lalruatfela P.L., Saminathan M., Ingole R.S., Dhama K., Joshi M.V.** (2014). Toxicopathology of paraquat herbicide in female wistar rats. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances.* 9 (9): 523-542.
- Landgraf M.D., Silvia M.D.D.A., M.O. Rezende. M.O.D.E.O.** (1998). Mechanism of metribuzin herbicide sorption by humic acid samples from peat and vermicompost. *Analytica chimica Acta.* 368 (1-2) : 155-164.
- Lau A.T., Wang Y., Chiu J.F.** (2008). Reactive oxygen species: current knowledge and applications in cancer research and therapeutic. *J Cell Biochem.* 104 (2): 657-667.
- Layné F., Guyader D.** (2003). Conduite à tenir devant une cytolysse chronique. *Encyclopédie médico-chirurgicale. Hépatologie*. Paris : Elsevier SAS.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Ledirac N., Antherieu S., d'Uby A.D., Caron J.C., Rahmani R.** (2005). Effects of organochlorine insecticides on MAP kinase pathways in human HaCaT keratinocytes: key role of reactive oxygen species. *Toxicological Sciences*. **86** (2): 444-452.
- Lee W.J., Huang M.S., Yang I.C., Lai T.C., Wang J.L., Pang V.F., Hsiao M., Kuo M.Y.** (2008). Essential roles of caspases and their upstream regulators in rotenone induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*. **371** (1): 33-38.
- Lehucher-Michel M.P., Lesgards J.F., Delubac O., Stocker P., Durand P., Prost M.** (2001). Stress oxydant et pathologies humaines. *La Presse médicale*. 30: 1076-1081.
- Leighton T., Ginther C., Fluss L., Harter W., Cansado J., Notarie V.** (1992). Phenolic Compounds in Foods and their Effects on Health II. Huang M.T., Ho C.T., Lee C.Y. (eds.), American Chemical Society Symposium Series 507, Washington D.C. p 220.
- Levine R.L.** (2002). Carbonyl modified proteins in cellular regulation; aging and disease. *Free Radic Biol Med*. **32** (9): 790-6.
- Li Q., Kawada T.** (2006). The mechanism of organophosphorus pesticide-induced inhibition of cytolytic activity of killer cells. *Cellular and Molecular Immunology*. **3** (3): 171-178.
- Li C., Cheng Y., Tang Q., Lin S., Li Y., Hu X., Nian J., Gu H., Lu Y., Tang H., Dai S., Zhang H., Jin C., Zhang H., Jin Y., Jin Y.** (2014). The association between prenatal exposure to organochlorine pesticides and thyroid hormone levels in new borns in Yancheng, China. *Environment International*. 129: 47-51.
- Lindi J.K., Hyde G.M.** (2003). Evaluation of abnormal liver function tests. *Postgrad Med J*. **79** (932): 307-12.
- Lin C., Chen C., Liang Y., Lin J.** (2002). Molecular modeling of flavonoids that inhibits xanthine oxidase. *Biochem Biophys Res Commun*. **294** (1): 167-72.
- Lirdprapamongkol K., Sakurai H., Kawasaki N., Choo M.K., Saitoh Y., Aozuka Y., Singhirunnusorn P., Ruchirawat S., Svasti J., Saiki I.** (2005). Vanillin suppresses in vitro invasion and in vivo metastasis of mouse breast cancer cells. *Eur J Pharm Sci*. **25** (1): 57-65.
- López-Piñeiro A., Peña D., Albarrán A., Becerra D., Sánchez-Llerena J.** (2013). Sorption, leaching and persistence of metribuzin in Mediterranean soils amended with olive mill waste

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

of different degrees of organic matter maturity. *Journal of Environmental Management*. **122** (515) : 76-84.

Luc G., Lecerf J.M., Bard J.M., Hachulla E., Fruchart J.C., Devulder B. (1991). Cholestérol et athérosclérose. Masson, collection Abrégés, Paris.

Lüttge U., Kluge M., Bauer G. (1996). Botanique. Tec & Doc Lavoisier, Paris. Chap 3. 79-82.

Lushchak V.I. (2011). Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic Toxicology*. 101: 13-30.

Lyons G. (2000). Mixed messages : pesticides that confuse hormones. Pesticides Action Network UK.

Mac Laren D. (2007). Advances in sports and exercise science series. Nutrition and Sport. 8. Antioxidants and free radicals by Close GL and Mc Ardle F. Elsevier.

Majumdar K., Singh N. (2007). Effect of soil amendments on sorption and mobility of metribuzin in soils. *Chemosphere*. 66 : 630-637.

Makni M., Chtourou Y., Fetoui H., Garoui E.M., Barkallah M., Marouani C., Kallel C., Zeghal N. (2012). Erythrocyte oxidative damage in rat treated with CCl₄: protective role of vanillin. *Toxicol Ind Health*. **28** (10): 908-16.

Makni M., Chtourou Y., Fetoui H., Garoui E.M., Boudawara T., Zeghal N. (2011). Evaluation of the antioxidant, anti-inflammatory and hepatoprotective properties of vanillin in carbon tetrachloride-treated rats. *Eur J Pharmacol*. **668** (1-2): 133-9.

Maksymiv I.V., Husak V.V., Mosiichuk N.M., Matviishyn T.M., Sluchy I.Y., Storey J.M., Storey K.B., Lushchak V.I. (2015). Hepatotoxicity of herbicide Sencor in goldfish may result from induction of mild oxidative stress. *Pestic Biochem Physiol*. 122:67-75.

Malloy H.T. (1937). The determination of bilirubin with the photoelectric colorimeter. *J. Biol Chem*. **112** (2): 481-491.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Manach C., Morand C., Demigne C., Texier O., Regeat F., Remesy C. (1997). Bioavailability of rutin and quercetin in rats. *FEBS Letters*. 409 : 12-16.

Manach C., Scalbert A., Morand C., Rémésy C. (2004^b). Consommation et biodisponibilité des polyphénols. In: *Les polyphénols en agroalimentaire*, Tec et Doc (éd.), Paris. 361-390.

Manach C., Scalbert A., Morand C., Remesy C., Jimenez L. (2004^a). Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr*. **79** (5): 727-47.

Manach C., Scalbert A., Remesy C., Morand C. (2006). Consommation et disponibilité des polyphénols. In: *Les polyphénols en agroalimentaire*. P. Sarni-Manchado and V. Cheynier (Ed). Paris, Lavoisier. 361-380.

Manach C., Williamson G., Morand C., Scalbert A., Remesy C. (2005). Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am J Clin Nutr*. 81: 230S-242S.

Marnett L.J. (1999). Lipid peroxidation-DNA damage by Malondialdehyde. *Mutat Res*. 424 : 83-95.

Maroni M., Colosio C., Ferioli A., Fait A. (2000). Biological monitoring of pesticide exposure: a review. *Toxicology*. **143** : 5-118.

Martin S., Andriantsitohaina R. (2002). Cellular mechanism of vasculo-protection induced by polyphenols on the endothelium. *Ann Cardiol Angeiol*. **51** (6): 304-315.

Maslamani N.O. (2016). Ice Concentration Linked with Extractive Stirrer (ICECLES). *Theses and Dissertations*. 982.

Mate J.M., Perez-Gomez C., Numez de castro I. (1999). Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem*. **32** (8) : 595-603.

Matés J.M., Pérez-Gómez C., Núñez de Castro I. (1999). Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem*. **32** (8): 595-603.

Mathias A.L., Lopretti M.I., Rodrigues A.E. (1995). Chemical and biological oxidation of Pinus pinaster lignin for the production of vanillin. *J. Chem. Tech. Biotechnol*. 64 : 225-234.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Matsukawa N., Matsumoto M., Hara H. (2009). High biliary excretion levels of Quercetin metabolites after administration of a quercetin glycoside in conscious bile duct cannulated rats. *Biosci Biotechnol Biochem.* **73** (8): 1863-1865.

McLennan H.R., Degli Esposti M. (2000). The contribution of mitochondrial respiratory complexes to the production of reactive oxygen species. *J Bioenerg Biomembr.* **32** (2): 153-62.

Medjdoub A., Merzouk S.A., Merzouk H., Chiali F.Z., Narce M. (2011). Effects of mancozeb and metribuzin on in vitro proliferative responses and oxidative stress of human and rat spleen lymphocytes stimulated by mitogens. *Pesticide Biochemistry and Physiology.* **101**: 27-33.

Mehra B.L., Sharma P., Kaushik U., Joshi S.C. (2014). Effect of fytolan on haematology and serum parameters of male albino rats. *International Journal of Pharma Research and Health Sciences.* **2**: 332-338.

Mehri N., Felehgari H., Harchegani A.L., Behrooj H., Kheiripour N., Ghasemi H., Mirhoseini M., Ranjbar A. (2016). Hepatoprotective effect of the root extract of green tea against malathion-induced oxidative stress in rats. *HerbMed Pharmacol.* **5** (3): 116-119.

Mehrpak M., Banaee M., Haghi B.N., Noori A. (2015). Protective effects of vitamin c and chitosan against cadmium-induced oxidative stress in the liver of common carp (*Cyprinus carpio*). *Iran J Toxicol.* **9** (30): 1360-1367.

Memon S.A., Shaikh S.A., Memon N. (2014). Effects of profenofos an endocrine disrupting chemical on leydig's cells in rabbits. *J. Anim. Plant Sci.* **24** (1): 167-171.

Mengistie B.T., Mol A.P.J., Oosterveer P. (2016). Private Environmental Governance in the Ethiopian Pesticide Supply Chain: Importation, Distribution and Use. *NJAS - Wageningen Journal of Life Sciences.* **76** : 65-73.

Menon S.G., Goswami P.C. (2007). A redox cycle within the cell cycle: ring in the old with the new. *Oncogene.* **26** : 1101-9.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Middleton E., Kandaswami C., Theoharidies T.C. (2000). The effects of plant flavonoids on mammalian cells : implications for inflammation, heart disease and cancer. *Pharmacological reviews*. 52: 673-751.

Mills G.C. (1957). Hemoglobin catabolism. I. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. *J Biol Chem*. **229** (1) : 189-97.

Mirkhalaf F., Mason T.J., Morgan D.J., Saez V. (2011). Frequency Effects on the Surface Coverage of Nitrophenyl Films Ultrasonically Grafted onto Indium Tin Oxide. *Langmuir*. 27 : 1853.

Mitre A., Chatterjee C., Mandal F.B. (2011). Synthetic chemical pesticides and their effects on Birds. *J. Environ. Toxicol*. **5**: 81-96.

Mladenović J.M., Paunović M.G., Matic M.M., Knežević V.S., Ognjanović B.I., Štajn AS, Saičić A.S. (2014). Copper-induced changes of lipid peroxidation and hemato-biochemical parameters in rat blood: protective role of flavonoids. *Arch. Biol. Sci., Belgrade*. 66: 1271-1279.

Mlcek J., Jurikova T., Skrovankova S., Sochor J. (2016). Quercetin and Its Anti-Allergic Immune Response. *Molecules*. 21 : 623.

Mompon B., Lemaire B., Mengal P., Surbel D. (1996). Extraction des polyphénols : du laboratoire à la production industrielle. IN “ Polyphénols 96 ”. Ed INRA. 31-35.

Monteil C., Mulder P., Thuillez C. (2004). Stress oxydant et insuffisance cardiaque: une cible thérapeutique utopique?. *Médecine thérapeutique Cardiologie*. 2: 75-85.

Morandat S., Durand G., Polidori A., Desigaux L., Bortolato M., Roux B., Pucci B. (2003). PBN derived amphiphilic spin-traps. I/Synthesis and study of their miscibility with polyunsaturated phospholipids. *Langmuir*. **19** (23): 9699-9705.

Morel Y., Barouki R. (1999). Repression of gene expression by oxidative stress. *Biochem J*. **15** (3): 481-496.

Moser V.C. (2007). Animal models of chronic pesticide neurotoxicity. *Hum Exp Toxicol*. **26** (4) : 321-331.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Mossa A.H., Heikal T.M., Belaiba M., Raelison E.G., Ferhout H., Bouajila J.** (2015). Antioxidant activity and hepatoprotective potential of *Cedrelopsis grevei* on cypermethrin induced oxidative stress and liver damage in male mice. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. **15** (251) : 2-10.
- Mourtzinou I., Konteles S., Kalogeropoulos N., Karathanos V.T.** (2009). Thermal oxidation of vanillin affects its antioxidant and antimicrobial properties. *Food Chemistry*. **114** (3): 791-797.
- Mullen W., Graf B.A., Caldwell S.T., Hartley R.C., Duthie G.G., Edwards C.A., Lean M.E., Crozier A.** (2002). Determination of flavonol metabolites in plasma and tissues of rats by HPLC-radiocounting and tandem mass spectrometry following oral ingestion of [2-(14) C] quercetin-4'-glucoside. *J Agric Food Chem*. **50** (23) : 6902-9.
- Mullen W., Rouanet J.M., Auger C., Teissedre P.L., Caldwell S.T., Hartley R.C., Lean M.E., Edwards C.A., Crozier A.** (2008). Bioavailability of [2-C-14] Quercetin-4'-glucoside in Rats. *J Agric Food Chem*. **56** (24) : 12127-37.
- Murray R.** (1984). Alanine aminotransferase. Kaplan A et al .*Clin chem*. The C.V. Mosby Co. Si louis. Tronto. Princeton. 1088-1090.
- Murray R.** (1984). Aspartate aminotransferase. Kaplan A et al .*Clin chem*. The C.V. Mosby Co. Si louis. Tronto. Princeton. 1112-1116.
- Murray R.** (1984). Creatinine. Kaplan A et al. *Clin chem*. The C.V. mosby Co. Si louis.Tronto. Princeton. 1261-1266.
- Nair J., Barbin A., Velic I., Bartsch H.** (1999). Etheno DNA-base adducts from endogenous reactive species. *Mutat*. 424 : 59-69.
- Naito H.K.** (1984). Cholesterol. *Clin. Chem*. Toronto. Princeton. 1194-11206.
- Naravaneni R., Jamil K.** (2007). Determination of AChE levels and genotoxic effects in farmers occupationally exposed to pesticides. *Human and Experimental Toxicology*. **26** (9) : 723-731.
- Nauen R., Bretchneider T.** (2002). New modes of action of insecticides. *Pestic outlook*. 241-245.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Nazam N., Iqbal Lone M., Sharma M., Khan A.A., Kelany A.M., Ahmad W.** (2015). Biochemical and cytoarchitectural evaluation of dimethoate intoxication in rat liver and kidney: an in vivo study. *Indo American Journal of Pharmaceutical Research*. **5** (3): 1127-37.
- Newairy A.A., Abdou H.M.** (2013). Effect of propolis consumption on hepatotoxicity and brain damage in male rats exposed to chlorpyrifos. *Afr. J. Biotechnol.* **12** (33) : 5232-5243.
- Nhuan B.X.** Le vanillisme. (1954). In G.Bouriquet (ed.) : *Le vanillier et la vanille dans le monde*, Paul Lechevalier : 647-661.
- Niazi J., Kaur N., Sachdeva R.K., Bansal Y., Gupta V.** (2014). Antiinflammatory and antinociceptive activity of vanillin. *Drug Dev Ther.* **5** (2):145-7.
- Nicholls D.G., Ferguson S.J.** (2002). *Bioenergetics*. 3rd edn, chs. Amsterdam: Academic Press. p297.
- Niki E.** (2009). Lipid peroxidation: physiological levels and dual biological effects. *Free Radic Biol Med.* **47** (5): 469-84.
- Niki E.** (2010). Assessment of Antioxidant Capacity in vitro and in vivo. *Free Radic Biol Med.* **49** (4): 503-15.
- Niki E., Yoshida Y., Saito Y., Noguchi N.** (2005). Lipid peroxidation: mechanisms, inhibition, and biological effects. *Biochem Biophys Res Commun.* **338** (1): 668-76.
- Nwozo S., Akpodono E., Oyinloye B.** (2015). Plasma, erythrocyte membrane bound enzymes and tissue histopathology in male Wistar rats exposed to common insecticides. *J. Pestic. Sci.* **40** (1) : 13-18.
- Ogundajo A., Imoru J., Kade I., Olawoye T.** (2014). Quercetin elevates antioxidant status and modulates ouabain-sensitive transmembrane sodium pump in rat brain. *The Pharma Innovation Journal.* **3**: 69-75.
- Ojo O.A., Oyinloye B.E., Ajiboye B.O., Ojo A.B., Musa H., Olarewaju O.I.** (2014). Dichlorvos-induced oxidative stress in rat brain: Protective effects of the ethanolic extract of *Alstonia boonei* stem bark. *Asian J Pharm.* **8**:216-21.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Olayinka E.T., Ore A., Ola O.S., Adeyemo O.A. (2014). Protective effect of quercetin on melphalan-induced oxidative stress and impaired renal and hepatic functions in rat, *Chemotherapy Research and Practice*. 8 p.

Olayinka E.T., Ore A., Adeyemo O.A., Ola O.S., Olotu O.O., Echebiri R.C. (2015). Quercetin, a flavonoid antioxidant, ameliorated procarbazine-induced oxidative damage to murine tissues. *Antioxidants*. 4 : 304–321.

Oliva A., Spira A., Multigner L. (2001). Contribution of environmental factors to the risk of male infertility. *Hum Reprod*. **16** (8): 1768-1776.

Oliveira C.B.S, Meurer Y.S.R, Oliveira M.G., Medeiros W.M.T.Q, Silva F.O.N, Brito A.C.F, Pontes D.D.L., Andrade-Neto V.F. (2014). Comparative study on the antioxidant and anti-Toxoplasma activities of vanillin and its resorcinarene derivative. *Molecules*. 19 : 5898-912.

Onil S. (2005). Votre santé vous préoccupe? Attention aux pesticides. CRAAQ, colloque sur la serriculture. p 16.

ORP. (2010). Observatoire des Résidus de Pesticides. Exposition de la population générale aux résidus de pesticides en France. Rapport scientifique. 354 p.

ORSB. (2001). Observatoire Régional de Santé de Bretagne, Effets chroniques des pesticides sur la santé : état actuel des connaissances. <http://www.observatoire-pesticides.gouv.fr/index.php?pageid=224>.

Osuala F.I., Otitolaju A.A., Igwo-Ezikpe M.N. (2014). Usefulness of liver and kidney function parameters as biomarkers of ‘heavy metals’ exposure in a mammalian model *Mus musculus*. *Afr. J. Biochem. Res.* **8** (3) : 65-73.

Othmer K. (2005). Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology. Vol 12, 5th Edition, John Wiley & Sons.

oxidative damage in human disease. *Clin Chem*. 52, 601-623.

Ozcan T., Akpınar-Bayizit A., Yılmaz-Ersan L., Delikanlı B. (2014). Phenolics in Human Health. *International Journal of Chemical Engineering and Applications*. **5** (5) : 393-396.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Pacifici E.H., McLeod L.L., Sevanian A. (1994). Lipid hydroperoxide-induced peroxidation and turnover of endothelial cell phospholipids. *Free radical biology & medicine*. **17** (4): 297-309.

Palmer R.M., Rees D.D., Ashton D.S., Moncada S. (1988). L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation. *Biochem Biophys Res Commun*. **153** (3): 1251-6.

Pamplona R., Costantini D. (2011). Molecular and structural antioxidant defenses against oxidative stress in animals. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. **301** (4) : 843-63.

Pamplona R., Portero-Otin M., Ruiz C., Gredilla R., Herrero A., Barja G. (2000). Double bond content of phospholipids and lipid peroxidation negatively correlate with maximum longevity in the heart of mammals. *Mech. Ageing. Dev.* **112** (3): 169-183.

Pandey A., Rudraiah M. (2015). Analysis of endocrine disruption effect of Roundup® in adrenal gland of male rats. *Toxicology Reports* 2. 1075-1085.

Paredi P., Kharitonov S.A., Barnes P.J. (2002). Analysis of expired air for oxidation products. *Am J Respir Crit Care Med*. 166 : 31-7.

Park H.H., Lee S., Son H.Y., Park S.B., Kim M.S., Choi E.J., Singh T.S., Ha J.H., Lee M.G., Kim J.E., Hyun M.C., Kwon T.K., Kim Y.H., Kim S.H. (2008). Flavonoids inhibit histamine release and expression of proinflammatory cytokines in mast cells. *Arch Pharm Res*. **31** (10): 1303-11.

Patterson R.A., Horsley E.T.M., Leake D.S. (2003). Prooxidant and antioxidant properties of human serum ultrafiltrates toward LDL: Important role of uric acid. *J Lipid Res*. **44** (3): 512-21.

Pattwell D.M., Jackson M.J. (2004). Contraction-induced oxidants as mediators of adaptation and damage in skeletal muscle. *Exerc Sport Sci Rev*. **32** (1): 14-18.

Pay Yu B. (1994). Cellular defences against damage from reactive oxygen species. *Physiol*.

Peitl P.J., Sakamoto-Hojo E.T., De Syllos Colus I.M. (1996). Genotoxic activity of the insecticide Nuvacron (Monocrotophos) detected by the micronucleus test in bone marrow erythrocytes of mice and in CHO cells. *Brazilian journal of Genetics*. **19** (4) : 571-576.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Penna C., Mancardi D., Rastaldo R., Pagliaro P. (2009). Cardio protection: A radical view Free radicals in pre and post conditioning. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. **1787** (7) : 781-793.

Pietta P.G. (2000) Flavonoids as antioxidants. *J Nat Prod*. **63** (7): 1035-42.

Pimentel D. (1995). Amounts of pesticides reaching target pests: Environmental impacts and ethics. *J. Agric. Environ. Ethics*. **8** (1) : 17-29.

Piskula M.K., Terao J. (1998). Accumulation of (-)-epicatechin metabolites in rat plasma after oral administration and distribution of conjugation enzymes in rat tissues. *J Nutr*. **128** (7): 1172-8.

Plhalova L., Blahova J., Mikulikova I., Stepanova S., Dolezelova P., Praskova E., Marsalek P., Skoric M., Pistekova V., Bedanova I., Svobodova Z. (2012). Effects of subchronic exposure to atrazine on zebrafish (*Danio rerio*). *Polish Journal of Veterinary Sciences*. **15** (3) : 417-423.

Plhalova L., Stepanova S., Praskova E., Chromcova L., Zelnickova L., Divisova L., Skoric M., Pistekova V., Bedanova I., Svobodova Z. (2012). The Effects of Subchronic Exposure to Metribuzin on *Danio rerio*. *The Scientific World Journal*. p. 6.

Portères R. (1954). Le genre *Vanilla* et ses espèces. In: Lechevalier P, ed. *Le vanillier et la vanille dans le monde*. Paris. 94-290.

Powers S.K., Smuder A.J., Kavazis A.N., Hudson M.B. (2010). Experimental guidelines for studies designed to investigate the impact of antioxidant supplementation on exercise performance. *Int J Sport Nutr Exerc Metab*. **20** (1): 2-14.

Pratt D., Kaplan M.M. (2005). Evaluation of the patient with liver disease. Evaluation of Liver Function. In : Kasper D.L., Fauci A.S., Longo D.L., Braunwald E., Hauser S.L., Jameson J.L. *Harrison's principles of internal medicine 16^{ème} edition*. New York : Mc GrayHill Medical Publishing Division. 1813-6.

Prior R.L., Wu X. (2006). Anthocyanins: structural characteristics that result in unique metabolic patterns and biological activities. *Free Radic Res*. **40** (10): 1014-28.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Priyadarsini K. I. (2005). Molecular Mechanisms Involving Free Radical Reactions of Antioxidants and Radioprotectors. Founder's Day Special Issue. 1-6.

Prouvost H., Declercq C. (1998). Evaluation de l'impact sanitaire de la pollution atmosphérique : les apports de l'épidémiologie, in Air Pur 55 – Plan Régional pour la Qualité de l'Air dans le Nord – Pas de Calais. APPA. 30-35.

Quesada-Molina C., Garcia-Campana A.M., del Olmo-Iruela L., del Olmo M. (2007). Large volume sample stacking in capillary zone electrophoresis for the monitoring of the degradation products of metribuzin in environmental samples ». *Journal of Chromatography A*. **1164** : 320-328.

Qutub A.A, Popel A.S. (2008). Reactive oxygen species regulate hypoxia-inducible factor 1 α differentially in cancer and ischemia. *Mol Cell Biol*. **28** (16): 5106-19.

Rajagopal P.L., Premaletha K., Kiron S.S., Sreejith K.R. (2013). A review on nephroprotective herbs and herbal formulations. *IJPCS*. **2** (4).

Regnault-Roger C. (2005). Enjeux phytosanitaires pour l'agriculture et l'environnement. Tec & Doc, Lavoisier, Paris. 1013 p.

Regoli F., Giuliani M.E. (2014). Oxidative Pathways of Chemical Toxicity and Oxidative Stress Biomarkers In Marine Organisms. *Marine environmental research*. 93: 106-117.

Reitman S., Frankel S. (1957). A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases. *Amer. J. Clin. Pathol*. 28: 56-63.

Rezaie Agdam H., Razi M., Amniattalab A., Malekinejad H., Molavi M. (2017). Co-administration of vitamin E and testosterone attenuates the atrazine-induced toxic effects on sperm quality and testes in rats. *Cell J*. 19 (2): 292-305.

Richard Y., GIROUX I. (2004). Impact de l'agriculture sur les communautés benthiques et piscicoles du ruisseau Saint-Georges (Québec, Canada). Ministère de l'Environnement, Direction du suivi de l'état de l'environnement. 28 p.

Richter G. (1993). Composés phénoliques in *Métabolisme des végétaux: physiologie et biochimie*. Ed Presse polytechnique et universitaire romande. 317-339.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Rio M.J., Velez-Pardo C.** (2008). Paraquat induces apoptosis in human lymphocytes: protective and rescue effects of glucose, cannabinoids and insulin-like growth factor-1. *Growth Factors*. **26** (1): 49-60.
- Rohdewald P.** (2002). A review of the French maritime pine bark extract (Pycnogenol (R)), a herbal medication with a diverse clinical pharmacology. *Int J Clin Pharmacol Ther*. **40** (4): 158-168.
- Rosalki S. et al.** (1993). *Clin. Chem.* 39/4 : 648-652.
- Rothwell J.A., Day A.J., Morgan M.R.A.** (2005). Experimental determination of octanol water partition coefficients of quercetin and related flavonoids. *J Agric Food Chem*. **53** (11): 4355-60.
- Roussel A.M., Nève J., Hininger I.** (2005). Antioxydants et nutrition. Radicaux libres et stress oxydant. Paris, Lavoisier. 261-280.
- Rowe A.M., Brundage K.M., Barnett J.B.** (2007). In vitro atrazine-exposure inhibits human natural killer cell lytic granule release. *Toxicol Appl Pharmacol*. **221**(2) : 179-188.
- Sainvitu P., Nott K., Richard G., Blecker C., Jérôme C., Wathelet J.P., Paquot M., Deleu M.** (2012). Structure, properties and obtention routes of flaxseed lignan secoisolariciresinol: a review. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ*. **16** (1) : 115-124.
- Salameh P.R., Waked M., Baldi I., Brochard P., Saleh B.A.** (2006). Chronic bronchitis and pesticide exposure: a case-control study in Lebanon. *Eur J Epidemiol*. **21** (9): 681-688.
- Sanchez-Bayo F., Baskaran S., Kennedy I.R.** (2002). Ecological relative risk (EcoRR): another approach for risk assessment of pesticides in agriculture. *Agric. Ecosyst. Environ*. 91 (1-3) : 37-57.
- Sarni-Manchado P., Cheynier V.** (2006). Les polyphénols en agroalimentaire. Ed Tec et Doc Lavoisier. 02-11.
- Sarwar M., Salman M.** (2015). Biological insecticide *Trichogramma* spp. (Hymenoptera: Trichogrammatidae) strikes for caterpillar control. *International Journal of Entomology Research*. **1** (1): 31- 36.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Saulsbury M.D., Heyliger S.O., Wang K., Round D. (2008). Characterization of chlorpyrifos-induced apoptosis in placental cells. *Toxicology*. **244**: 98-110.

Scalbert A., Williamson G. (2000). Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J Nutr*. **130**: 2073S-2085S.

Schrader M., Fahimi H.D. (2006). Peroxisomes and oxidative stress. *Biochim Biophys Acta*. **1763** (12):1755-1766.

Seiva F.R.F., Chuffa L.G.A., Braga C.P., Amorim J.P.A., Fernandes A.A.H. (2012). Quercetin ameliorates glucose and lipid metabolism and improves antioxidant status in postnatally monosodium glutamate-induced metabolic alterations. *Food Chem Toxicol*. **50** (10): 3556-61.

Severin F., Tissut M. (1991). Principes de l'utilisation des herbicides. In : Les herbicides, mode d'action et principes d'utilisation, R. Scalla éd., INRA. 281-332.

Sharma P., Huq A.U., Singh R. (2013). Cypermethrin induced reproductive toxicity in male wistar rats: protective role of *Tribulus terrestris*. *Journal of Environmental Biology*. **34**: 857-862.

Sharma P., Singh R., Jan M. (2014). Dose-Dependent Effect of Deltamethrin in Testis, Liver, and Kidney of Wistar Rats. *Toxicol Int*. **21** (2): 131-139.

Shebis Y., Iluz D., Kinel-Tahan Y., Dubinsky Z., Yehoshua Y. (2013). Natural antioxidants: function and sources. *Food and Nutrition Sciences*. **4**: 643-649.

Sidhu I.P.S., Bhatti J.S., Bhatti G.K. (2014). Modulatory action of melatonin against chlorpyrifos induced hepatotoxicity in Wistar rats. *Asian Journal of Multidisciplinary Studies*. **2** (9).

Sief M.M., Khalil F.A., Abou Arab A.A.K., Abou Donia M.A., El-Sherbiny A.M., Mohamed S.R. (2015). Ameliorative role of *Melissa officinalis* against hepatorenal toxicities of organophosphorus Malathion in male rats. *MOJ Toxicol*. **1** (3): 00014.

Sies H. (1991). Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am J Med Vol*. **91** (3): 31-38.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Sies H.** (1993). Strategies of antioxidant defense. Europe. Eur J Biochem. **215** (2): 213-9.
- Sies H.** (1999). Glutathione and its role in cellular functions. Free Radic Biol Med. **27** (9-10): 916-21.
- Simic M.G., Jovanovic S.V.** (1989). Antioxidation mechanisms of uric acid. Journal of the American Chemical Society. **111** (15): 5778-82.
- Socynska-Kordala M., Bakowska A., Oszmiansky J., Gabrielska J.** (2001). Metal-ion flavonoid associations in bilayer phospholipid membranes. Cell Mol Biol Lett. **6** : 277-81.
- Sohal R.S., Mockett R.J., Orr W.C.** (2002). Mechanisms of aging: an appraisal of the oxidative stress hypothesis. Free Rad Biol Med. **33** (5): 575-86.
- Soto Arenas M.A.** (2003). Vanilla. In: Pridgeon A.M., Cribb P.J., Chase M.W., Rasmussen F.N., eds. Genera orchidacearum: Orchidoideae. Vol. 3. USA: Oxford University Press. 321-334.
- Souci S.W., Fachmann W., Kraut H.** (2008). La composition des aliments - Tableaux des valeurs nutritives (7^{ème} édition). Medpharm Scientific Publishers, Taylor & Francis CRC Press (eds.). p 1364.
- Souza G.D.S., Costa L.C.A.D., Maciel A.C., Reis F.D.V., Pamplona Y.D.A.P.** (2017). Presence of pesticides in atmosphere and risk to human health: a discussion for the Environmental Surveillance. Ciência & Saúde Coletiva. **22** (10): 3269-3280.
- Stahl W., Sies H.** (1997). Antioxidant defense: vitamins E and C and carotenoids. Diabetes. **46**: S14-8.
- Stahl W., Sies H.** (2002). Carotenoids and protection against solar UV radiation. Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol. **15** (5): 291-6.
- Stark G.** (2005). Functional consequences of oxidative membrane damage. J Membr Biol. **205** (1): 1-16.
- Stenrod M., Perceval J., Benoit P., Almvik M., Bolli R.I., Eklo O.M., Sveistrup T.E., Kvaerner J.** (2008). Cold climatic conditions: Effects on bioavailability and leaching of the

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

mobile pesticide metribuzin in a silt loam soil in Norway. *Cold Regions Science and Technology*. **53** (1) : 4-15.

Steeve H.T., Reynier P., Lenaers G. (2013). Neurotoxicity of pesticides: its relationship with neurodegenerative diseases. *Med Sci (Paris)*. 29 : 273-278.

Sunol C., Babot Z., Fonfria E., Galofre M., Garcia D., Herrera N., Iraola S., Vendrell I. (2008). Studies with neuronal cells: From basic studies of mechanisms of neurotoxicity to the prediction of chemical toxicity. *Toxicol In Vitro*. **22** (5) : 1350- 1355.

Tang Y. Zhang W., Chen K., Feng S., Ji Y., Shen J., Reiman E.M., Liu Y. (2006). Arithmetic processing in the brain shaped by cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103 : 10775-10780.

Tanwar B., Modgil R. (2012). Flavonoids: Dietary occurrence and health benefits. *Spatula DD*. **2** (1): 59-68.

Testud F., Grillet J.P, Nisse C. (2007). Effets à long terme des produits phytosanitaires : le point sur les données épidémiologiques récentes. *Archives des Maladies Professionnelles et de l'Environnement*. **68** (4): 394-401.

Teuscher E., Anton R., Lobstein A. (2005). Plantes aromatiques, épices, aromates, condiments et huile essentielle. Editions TEC & DOC Lavoisier. p 522.

Thakur D., Singh P., Tripathi C, Bhadauria S, Jain S.K., Tripathi R.K. (2013). In Vitro Immunotoxicity Testing of Pesticides using Human Cytokine Promoter Based Reporter Cell Lines. *Clin Exp Pharmacol*. S4: 001.

Théron P., Bonnefont-Rousselot D. (2005). Systèmes antioxydants endogènes. In : Delattre J, Beaudoux JL, Bonnefont-Rousselot D (ed.). *Radicaux libres et stress oxydant. Aspects biologiques et pathologiques*. Tec & Doc Lavoisier, Paris. 87-111.

Thevenot G. (2015). De la prévention des risques au changement des pratiques agricoles : les limites du droit de la protection phytosanitaire. Université Nice Sophia Antipolis. France. p 18.

Tilgmann C., Ullmanen I. (1996). Purification methods of mammalian catechol-Omethyltransferases. *J Chromatogr B Biomed Appl*. 684: 147-161.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Toussaint-Samat M.** (1994). Histoire naturelle et morale de la nourriture. Edition Bordas.
- Trinder P.** (1969). Ann. Clin. biochem. **6**: 24-33.
- Tron I., Piquet O., Cohuet S.** (2001). Effets chroniques des pesticides sur la santé : état actuel des connaissances. Editon ORS Bretagne (Observatoire Régional de la Santé). 88 p.
- Tsao R.** (2010). Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. Nutrients. **2** (12) : 1231-1246.
- Turrens J.F.** (1997). Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. Bioscience Rep. **17**: 3-8.
- Turrens J.F., Freeman B.A., Levitt J.G., Crapo J.D.** (1982). The effect of hyperoxia on superoxide production by lung submitochondrial particles. Arch. Biochem. Biophys. **217**: 401-410.
- Tutunaru B., Samide A., Moanță A., Ionescu C., Tigae C.** (2015). Electrochemical Study of Metribuzin Pesticide Degradation on Bismuth Electrode in Aqueous Solution. Int. J. Electrochem. Sci. **10** : 223-234.
- Une L., Gupta S.** (2013). Micronutrient and antioxidant status in children with protein energy malnutrition. Asian Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences. **3** (20): 38-40.
- Unsworth J.B., Wauchope R.D., Klein A.W., Dorn E., Zeeh E., Yeh S.M., Akerblom M., Racke K.D., Rubin B.** (1999). Significance of the long range transport of pesticides in the atmosphere. Pure Appl. Chem. **71** (7): 1359-83.
- Urquiaga I., Leighton F.** (2000). Plant polyphenol antioxidants and oxidative stress. Biol Res. **33** (2): 55-64.
- Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M.T.D, Mazur M., Telser J.** (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. Int J Biochem Cell Biol. **39** (1): 44-84.
- Valavanidis A., Vlahoyianni T., Fiotakis K.** (2005). Comparative study of the formation of oxidative damage marker 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) adduct from the nucleoside 2'-deoxyguanosine by transition metals and suspensions of particulate matter in relation to metal content and redox reactivity. Free Radic. Res. **39** : 1071-1081.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Vamecq J., Vallée L., Storme L., Gelé P., Bordet R. (2004). Les acteurs immédiats du stress oxydatif. Key players in oxidative stress. *La lettre du pharmacologue*. **18** (1) : 16-23.

Van der Werf H.M.G. (1996). Assessing the impact of pesticides on the environment. *Agric. Ecosyst. Environ.* **60** (2-3) : 81-96.

Van der Werf H.M.G., Zimmer C. (1998). An Indicator of Pesticide Environmental Impact Based on a Fuzzy Expert System. *Chemosphère*. **36** (10) : 2225-2249.

Vara Prasad W.L.N.V., Srilatha C., Sailaja N., Raju N.K.B., Jayasree N. (2016). Amelioration of Gamma-hexachlorocyclohexane (Lindane) induced renal toxicity by *Camellia sinensis* in Wistar rats. *Veterinary World*. **9** (11): 1331-1337.

Velisek J., Svobodova Z., Piackova V., Novotny L., Blahova J., Sudova E., Maly V. (2008). Effects of metribuzin on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Veterinarni Medicina*. **53**: 324-332.

Verma S.R., Rani S., Tonk P.I., Dalela R.C. (1983). Pesticide induced dysfunction in carbohydrate metabolism in three freshwater fishes. *Environ. Res.* **32** :127-133.

Vertuani S., Angusti A., Manfredini S. (2004). The antioxidants and proantioxidants network : an overview. *Curr Pharm Des.* **10** (14) : 1677-1694.

Villar J.C., Caperos A., García-Ochoa F. (1997). Oxidation of hardwood Kraft lignin to phenolic derivatives. Nitrobenzene and copper oxide as oxidants. *J. Wood Chem. Technol.* **17** (3) : 259-285.

Viswanathan V. (2001). Technical card of metribuzin; Envis center: Industrial toxicological Research center ; india.

Vitrac X., Desmoulière A., Brouillaud B., Krisa S., Deffieux G., Barthe N., Rosenbaum J., Mérillon J.M. (2003). Distribution of [¹⁴C]-trans-resveratrol, a cancer chemopreventive polyphenol, in mouse tissues after oral administration. *Life Sci.* **72** (20) : 2219-33.

Walton N.J., Mayer M.J., Narbad A. (2003). Molecules of interest-Vanillin. *Phytochemistry*. **63** : 505-515.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Wang W., Wang C., Ding X.Q., Pan Y., Gu T.T., Wang M.X., Liu Y.L., Wang F.M., Wang S.J., Kong L.D. (2013). Quercetin and allopurinol reduce liver thioredoxininteracting protein to alleviate inflammation and lipid accumulation in diabetic rats. *British Journal of Pharmacology*. 169 : 1352-1371.

Wauchope R.D., Buttler T.M., Hornsby A.G., Augustijn-Beckers P.W.M., Burt J.P. (1992). The SCS/ARS/CES pesticide properties database for environmental decision-making. *Reviews of Environment Contamination and Toxicology*. **123**: 1-157.

Weckbeker G., Cory J.G. (1988). Ribonucleotide reductase activity and growth of Glutathione-depleted mous leukemia L1210 cells in vitro. *Cancer letters*. 40 : 257-264.

Wenger C. et al. (1984). Alkaline phosphatase. Kaplan A et al .*Clin chem*. The C.V. Mosby Co. Si louis. Tronto. Princeton. 1094-1098.

Williams R.J., Spencer J.P.E., Rice-Evans K. (2004). Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? Serial Review (Ed. Rice-Evans) In: *Flavonoids and isoflavones (phytoestrogens): absorption, metabolism, and bioactivity*. *Free Radical Biol Med*. 36: 838-849.

Wolin M.S. (1996). Reactive oxygen species and vascular signal transduction mechanisms. *Microcirculation*. 3 : 1-17.

Worthing C.R., Walker S.B. (1987). *The Pesticide Manual: A World Compendium*, 8th Ed., Thornton Heath. British Crop Protection Council. 36-37.

Xhaxhiu K., Shllaku J., Sula L., Xhelaj A., Kota T. (2013). The removal of metribuzin from pesticide contaminated waters using natural and activated pprenjasi-clay. *Natura Montenegrina, Podgorica*. **12** (2): 505-19.

Yagi K. (1970). A rapid method for evaluation of autoxidation and antioxidants. *Agric.Biol. Chem*. **34** (1): 142-145.

Yahiaoui O., Aizel L., Lounici H., Drouiche N., Goosen M.F.A., Pauss A., Mameri N. (2011). Evaluating removal of metribuzim pesticide from contaminated groundwater using an electrochemical reactor combined with ultraviolet oxidation. *Desalination*. V. **270** : 84-89.

Yen G.C., Duh P.D., Tsai H.L. (2002). Antioxidant and pro-oxidant properties of ascorbic acid and gallic acid. *Journal of Food Chemistry*. **79** (3): 307-313.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Yoshikawa T., Toyokuni S., Yamamoto Y., Naito Y. (2000). Free Radicals in Chemistry, Biology and Medicine. Eds: OICA International, London.

Young J.F., Nielsen S.E., Haraldsdóttir J., Daneshvar B., Lauridsen S.T., Knuthsen P., Crozier A., Sandström B., Dragsted L.O. (1999). Effect of fruit juice intake on urinary quercetin excretion and biomarkers of antioxidative status. *Am J Clin Nutr.* **69** (1) : 87-94.

Yu H., Dickinson M., Chin Y.J., Kaufman B.N., Holben I., Geogdzhayev I., Mishchenko M.I. (2003). Annual cycle of global distributions of aerosol optical depth from integration of MODIS retrievals and GOCART model simulations. *J Geophys Res.* **108** : 10.

Zare S., Behzadi M., Tarzanan M., Beik Mohamadi M., Omid L., Babaei Heydarabadi A., Kazemi S. (2015). The impacts of pesticides on the health of farmers in Fasa, Iran. *Electron Physician.* **7** (4): 1168-1173.

Zelko I.N., Marian T.J., Folz R.J. (2002). Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, évolution, and expression. *Free Rad Biol Med.* **33** (3) : 337-349.

Zhang L., Jope R.S. (1999). Oxidative stress differentially modulates phosphorylation of ERK, p38 and CREB induced by NGF or EGF in PC12 cells. *Neurobiol Aging.* **20** (3): 271-8.

Zhao Y., Gao Z., Li H., Xu H. (2004). Hemin/nitrite/H₂O₂ induces brain homogenate oxidation and nitration: effects of some flavonoids. *Biochim Biophys Acta.* **1675**: 105-112.

Zhao Y., Yang X., Lu W., Liao H., Liao F. (2009). Uricase based methods for determination of uric acid in serum. *Microchimica Acta.* **164** (1): 1-6.

ANNEXES

PRÉPARATION DES SOLUTIONS :

1. Dosage du glutathion :

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

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

❖ Solution EDTA (0,02 M) :

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

❖ Solution DTNB (0,01 M) :

Dissoudre 200 mg DTNB dans 50 ml de méthanol absolu.

❖ Solution d'acide salicylique (0,25%) :

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

2. Dosage des protéines par la méthode de Bradford :

❖ Solution BSA (1mg/ml) :

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

❖ Réactif de Bradford :

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

3. Dosage du MDA :

❖ Solution TBS : Tris (50mM), NaCL (150mM) et pH 7,4 :

Dissoudre 8,775g NaCL dans 1L d'eau distillée, puis poser 6,057g Tris et compléter le volume à 1l par la solution NaCl (150mM) et ajuster le pH à 7,4 en ajoutant HCL ou NaOH.

❖ Solution TCA-BHT (TCA 20%, BHT 1%) :

Dissoudre 8,775g NaCL dans 1L d'eau distillée, puis poser 6,057g Tris et compléter le volume à 1l par la solution NaCl (150mM) et ajuster le pH à 7,4 en ajoutant HCL ou NaOH.

❖ **Solution TCA-BHT (TCA 20%, BHT 1%)**

Dissoudre 20g TCA dans 100 ml d'eau distillée pour obtenir la solution TCA 20% puis poser 1g de BHT et compléter le volume à 100 ml par la solution TCA 20% et agiter à chaud. TM

❖ **Solution HCl 0.6 M :**

51,56 ml d'HCl pur et compléter le volume à 1L par l'eau distillée. TM

❖ **Solution Tris-TBA (Tris 26 mM, TBA 120mM) :**

Dissoudre 3,149g Tris dans 1L d'eau distillée, puis poser 17,299g TBA et compléter le volume à 1L par la solution Tris (26 mM).

4. Dosage du glutathion peroxydase (GPx) : TM

❖ **Solution du GSH (0.1 mM) :**

Dissoudre 3,073 mg GSH dans 100 ml d'eau distillée. TM

❖ **Solution TCA (1%) :**

Dissoudre 1g TCA dans 100 ml d'eau distillée. TM

❖ **Solution DTNB (1.0 mM) :**

Dissoudre 100 mg DTNB dans 250 ml de méthanol absolu.

PUBLICATIONS



Quercetin Attenuates Metribuzin-induced Biochemical and Hematological Toxicity in Adult Rats

Lilia Kadeche¹, Ezzeddine Bourogaa², Amel Boumendjel¹, Assia Djefal¹, Cherif Abdennour³, Abdelfattah El Feki², Mahfoud Messarah*¹

¹Laboratory of Biochemistry and Environmental Toxicology, University of Badji Mokhtar, BP 12 Sidi Amar, Annaba, Algeria.

²Laboratory of Animal Ecophysiology, Faculty of Sciences, Sfax, Soukra Road, Km 3.5, BP 802, Sfax, Tunisia.

³Laboratory of Animal Ecophysiology, Faculty of Sciences, University of Badji Mokhtar, BP 12 Sidi Amar, Annaba, Algeria.

*Corresponding author's E-mail: mahfoud.messarah@univ-annaba.dz

Accepted on: 16-06-2016; Finalized on: 31-08-2016.

ABSTRACT

The current study evaluates the protective effect of quercetin (Que) against metribuzin (Mtz) pesticide induced adverse effects on hematological and biochemical parameters as well as oxidative stress in various tissues of rats. Thirty-two rats were equally divided into four groups; the first (CT) served as a control, the remaining groups were respectively treated with Que (50 mg/kg b.w.), metribuzin (133.33 mg/kg b.w.) and a combination of Mtz and Que. After 21 days of treatment, a significant decrease in the levels of red blood cells, haemoglobin and hematocrit were noticed in the metribuzin-exposed group when compared to the control. Serum glucose levels were increased along with total cholesterol, triglycerides and bilirubin after Mtz exposure. Metribuzin caused also a significant induction of oxidative damage in tissues as evidenced by increased levels of malondialdehyde, decreased levels of reduced glutathione, and lower activities of glutathione peroxidase. However, quercetin supplementation has significantly reduced adverse effects of metribuzin. These findings suggest that Que may have protective effects by improving the antioxidant status in tissues and ameliorating the harmful effects induced by Mtz.

Keywords: Metribuzin, Quercetin, Antioxidants, Oxidative stress, Pesticides.

INTRODUCTION

Over the past few decades, the use of pesticides in agriculture to preserve crops for humans and animals has resulted in their undesirable accumulation in the environment¹. Pesticides are xenobiotic, toxic and sometimes non-biodegradable and can cause serious problems to human health and environment².

Triazine herbicides constitute one of the largest groups of pesticides used throughout the world^{3,4}. Triazinones, such as metribuzin (4-amino-6-tert-butyl-4,5-dihydro-3-methylthio-1,2,4-triazin-5-one), are used worldwide to control broadleaf weeds in crops such as potatoes, soybeans and other vegetable crops⁵. As a result of its widespread use, metribuzin paid more attention as it considered a potential environmental contaminant⁶.

Metribuzin (Mtz) has been reported for its deleterious effects on human beings⁷, fishes^{8,9} and domestic animals¹⁰. In a study, the commercial formulation containing metribuzin was shown to cause changes in the metabolic parameters of male and female wistar rats. It has been reported that metribuzin was toxic to rats and the target organs were the liver, muscles, adipose tissue and intestine¹¹.

In addition, Medjdoub⁷ demonstrated that metribuzin has potentially induced immunotoxicity *in vitro*.

Environmental exposure to pesticides may affect human health by increasing the incidence of certain disorders. Their toxic effects are clearly mediated by reactive oxygen species (ROS) which can react with biological

molecules and initiate oxidative damage including protein oxidation, reduced glutathione (GSH) depletion and lipid peroxidation (LPO)¹².

Though, the organism has several biological defence mechanisms against intracellular oxidative stress¹³, involving endogenous (enzymatic and non-enzymatic) antioxidants such as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione (GSH), and exogenous antioxidants such as vitamin C, vitamin E, carotenoids and polyphenols¹⁴.

Thus, LPO rise, variations in the levels of GSH and antioxidant enzymes have been proposed as indicators of mediated oxidative stress¹². Studies of metribuzin toxicity have showed an increased oxidative stress and altered antioxidants status *in vitro*⁷ and *in vivo*¹¹.

To overcome oxidative stress, a positive correlation has been established between dietary supplementation with certain vegetables and plant products and the reduction of toxic effects of various environmental contaminants¹³. Studies on the antioxidative action of flavonoids, a group of compounds widespread throughout the plant kingdom, have been conducted very intensely in recent years^{15,16}.

Among these plant compounds, quercetin is being increasingly used in experimental studies¹⁷.

Quercetin (3, 3', 4', 5, 7-pentahydroxyflavone) is a typical flavonoid, largely present in fruits and vegetables. It has attracted a great deal of attention as a potential antioxidant¹⁸, where it has been shown that the majority of flavonoids like quercetin have five fold higher total antioxidant activities than vitamin E and C¹⁵. The



antioxidant properties of quercetin are mainly due to its ability to scavenge free radicals and reactive oxygen species (ROS) (superoxide anion, hydroxyl-radical), which lead to the inhibition of lipid peroxidation reactions and the elevation of antioxidant status¹⁹.

There has been indication in some animal experimentation that quercetin can protect organisms against the toxicity of exogenous poisons, such as insecticides²⁰. However, there are no reports regarding the role of quercetin (Que) against metribuzin induced oxidative stress. For this reason, an investigation concerning the possible protecting effect of quercetin against oxidative damage induced by metribuzin intoxicated male Wistar rats has been carried out.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

The commercial herbicide Metribuzin ($C_8H_{14}N_4OS$; CAS.No. metribuzin 21087-64-9) used in this study was obtained from (INRAA, Algeria). It was tested in the form of Sencor WP 70 pesticide, of which the active substance was metribuzin in the amount of 70%. All other reagents used were of high quality and analytical grade.

Animals

A total of 32 male Wistar rats weighing approximately 200–250 g were used for this experiment. They were procured from the Pasteur Institute (Algiers, Algeria). Rats were maintained under standard conditions of temperature (22 ± 2 °C), humidity (40 %) and photoperiod. Food (Standard diet, supplied by the "ONAB, EL-Harrouch", Algeria) and water were available ad-libitum. After two weeks of acclimatization, rats were divided among the control and test groups. The study protocol was approved by the institutional Animal Ethics Committee constituted in accordance with the National Institute of Health Guide-lines for Animal Care, Algeria.

Experimental Design

Animals were randomly divided into 4 groups (8 rats in each).

1. Control group, where rats received drinking water;
2. quercetin-treated group (Que), animals received quercetin (Sigma-Aldrich Co., Steinheim, Germany) dissolved in 0.9% saline solution and administered by daily intraperitoneal injection at dose of 50 mg/kg body weight/day (in a volume of 1 ml/kg body weight);
3. metribuzin-treated group (Mtz), animals received through drinking water 133,33 mg/kg body weight of metribuzin. Rats in group (1) and (3) were daily given physiological saline (0.9% NaCl, 1ml/kg body weight) by intraperitoneal injection (i.p.) during the whole course of the experiment.
4. group (Mtz + Que) was treated daily with both metribuzin and quercetin as in group two and three.

The doses of Mtz and Que were selected on the basis of previous works of Xhaxhiu²¹ and De Oliveira²² respectively. The dose of Mtz used in this study represents 1/20 of LD₅₀ (2345 mg/kg body weight) in rats.

The treatment was continued for a period of three consecutive weeks, and all individuals were weighed one every week. At the end of the experiment, total body weights were recorded and animals were sacrificed by decapitation without anesthesia to avoid animals stress. Different organs namely liver, kidney, brain and testis were removed and weighed in order to obtain the relative weight of each organ (%) which was calculated as g/100g body weight.

Blood Collection and Hematological Profile

At the time of sacrifice, blood samples for biochemical assays were collected in tubes without anticoagulant and serum was obtained by centrifugation of the samples for 15 min at (3000 rpm, 4 °C). Blood samples for hematological analysis were collected in tubes containing EDTA.

Hematological analysis was performed using an automatic hematological analyzer (Auto Hematology Analyz, MODEL PCE – 210N, Japan). Hematological parameters evaluated were total red blood cell (RBC), haemoglobin (Hb) concentration, hematocrit (HCT), mean corpuscular haemoglobin (MCH), mean corpuscular volume (MCV) and mean corpuscular haemoglobin concentration (MCHC).

Tissue Preparation

One gram of liver, kidney, brain and testis was homogenized in 2 ml of buffer solution of phosphate buffer saline 1:2 (w/v; 1g tissue with 2 ml TBS, pH 7.4), Homogenates were centrifuged at 10000 x g for 15 minutes at 4 °C, and the resultant supernatant was used for the determination of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), reduced glutathione and protein levels in one hand and the estimation of GSH-Px activity in the other hand.

Biochemical Profile

Biochemical analysis of serum samples was performed using commercial kits (Spinreact, Sant Esteve De Bas, Spain), according to the recommendations of the manufacturer. Biochemical parameters measured were glucose, triglycerides, cholesterol, urea, creatinine, bilirubin, total protein, alkaline phosphatase (ALP), aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT).

Determination of Lipid Peroxidation

The lipid peroxidation level in liver, kidney, brain and testis homogenates was measured as malondialdehyde (MDA) which is the end product of lipid peroxidation and reacts with thiobarbituric acid (TBA) as a TBARS to produce a red-colored complex with a peak absorbance



at 532 nm according to Buege and Aust²³. Thus, 125 ml of supernatant were homogenized by sonication with 50 ml of PBS, 125 ml of trichloroacetic acid–butylhydroxytoluene in order to precipitate proteins, and then centrifuged (1000g, 10 min, 4 °C). Then, 200 ml of supernatant were mixed with 40 ml of HCl (0.6M) and 160 ml of TBA dissolved in Tris, and then the mixture was heated at 80 °C for 10 min. The absorbance of the resultant supernatant was obtained at 530 nm. The amount of TBARS was calculated using a molar extinction coefficient of 1.56×10^5 M/cm.

Reduced Glutathione (GSH) Levels

GSH level was estimated using a colorimetric technique, as mentioned by Ellman²⁴, modified by Jollow.²⁵ This assay is based on the development of yellow colour when DTNB (5, 5' dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) is added to compounds containing sulfhydryl groups. In brief, 08 ml of liver supernatant was added to 0.3 ml of 0.25% sulfosalicylic acid, and then tubes were centrifuged at 2500 x g for 15 minutes. Supernatant (0.5 ml) was mixed with 0.025 ml of 0.01 M DTNB and 1 ml phosphate buffer (0.1 M, pH 7.4). The absorbance at 412 nm was recorded. Finally, total GSH content was expressed as nmol GSH/mg protein.

Glutathione Peroxidase (GPx) Activity

Glutathione peroxidase (GPx) (E.C. 1.1.1.1.9) activity was measured by the procedure of Flohe and Gunzler²⁶. Supernatant obtained after centrifuging 5 % liver, kidney, brain and testis homogenate at 15000 x g for 10 min followed by 10.000 x g for 30 min at 4 °C was used for GPx assay. 1 ml of reaction mixture was prepared which contained 0.3 ml of phosphate buffer (0.1 M, pH 7.4), 0.2 ml of GSH (2mM), 0.1 ml of sodium azide (10mM), 0.1 H₂O₂ (1mM) and 0.3 ml of liver supernatant. After incubation at 37 °C for 15min, the reaction was terminated by addition of 0.5 ml 5% TCA.

Tubes were centrifuged at 1500 x g for 5 min and the supernatant was collected. 0.2 ml of phosphate buffer (0.1M pH 7.4) and 0.7 ml of DTNB (0.4 mg/ml) were added to 0.1 ml of reaction supernatant. After mixing, absorbance was recorded at 420 nm.

Protein Assay

The protein content of tissues samples was measured by the method of Bradford²⁷, using bovine serum albumin as a standard.

Statistical Analysis

Data were analyzed using the statistical software MINITAB 16. Statistical analysis between all groups was performed with one-way ANOVA followed by Fisher's LSD (Least Significant Difference) test to evaluate the significance of differences.

All experimental data were expressed as means \pm standard deviation (SD). Means that do not share a letter are significantly different.

RESULTS

Effects of Treatments on Body, Absolute and Relative Weights

Table 1 shows body, absolute and relative organ weights (liver, kidney, brain and testis) of the control and experimental groups. The significant changes were occurred in the experimental groups when compared with the control.

The body weight has increased progressively throughout the study in all the groups associated with marked growth retardation of the rats treated by metribuzin, although there were no significant differences between them.

A significant increase of Mtz treated group in relative liver (+25.33%), kidney (+36.73%), brain (+12.19%) and testis (+9.43%) weights was also recorded, when compared with their respective control rats.

However, quercetin supplementation reserved these changes after 3 weeks of treatment.

Effects of Treatments on Plasma Hematological Parameters

The results of hematological profile in rats of control and treated group are presented in Table 2. Animals treated with metribuzin had significant lower RBC count (-17.16%), Hb (-20.38%), and HCT (-23.92%) compared to the control group.

The mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular haemoglobin (MCH), and mean corpuscular haemoglobin concentration (MCHC) were not statically significant than that of the control. Whereas in rats co-treated with quercetin, there were no significant changes in hematological parameters when compared with the control values.

Effects of Treatments on Plasma Biochemical Parameters

Data represented in Table 3 show that oral treatment with metribuzin caused significant decrease (- 9.03 %) in serum total protein, whilst a significant increase was noted in the level of glucose, urea, creatinine, bilirubin, cholesterol and triglycerides by (6.76; 43.34; 73.47; 41.96; 29.17 and +17.89%), respectively compared to the control. In addition, the activities of AST, ALT and ALP were significantly increased (+14.13; +40.64 and +54.78%) in metribuzin group compared to the control. In contrast, co-administration of quercetin to metribuzin treated animals restored most of these biochemical parameters to nearly normal levels.

Effects of Treatments on Lipid Peroxidation

Results showed that metribuzin treatment caused significant increases of TBARS levels (Figure 1, 2, 3 and 4) in all tissue tested (liver, +19.31%), (kidney, +19.13%), (brain, +20%), (testis, +19.05%); when compared with their respective controls. Quercetin administered at 50 mg/kg to rats of (Mtz+ Que) group alleviated lipid



peroxidation and modulated significantly the levels of MDA in liver, kidney, brain and testis.

Effects of Treatments on Reduced Glutathione Contents

Data concerning liver, kidney, brain and testis reduced glutathione contents are presented in Figure 1, 2, 3 and 4. In Mtz group, liver, kidney, brain and testis reduced glutathione levels were decreased by (27.43, 17.7, 14.59 and -22.97%), respectively. Administration of quercetin improved liver, kidney, brain and testis reduced

glutathione levels in (Mtz+ Que) group compared to those of Mtz group.

Effects of Treatments on Glutathione Peroxidase Activity

Data of glutathione peroxidase activity measured in liver, kidney, brain and testis are presented in Figure 1, 2, 3 and 4. In Mtz group, GPx activity in liver, kidney, brain and testis were decreased by (34.78, 18.75, 21.05 and -16.67%), respectively, compared to the control. However, administration of quercetin ameliorated GPx activity.

Table 1: Body weight, absolute and relative organ weights of control male rats, treated with quercetin, metribuzin and quercetin co-administrated with metribuzin, after 3 weeks of treatment.

Experimental Groups				
Parameters	Control	Que	Mtz	Mtz + Que
Initial body weight (g)	266.62 ± 33.36	269.5 ± 33.64	266.37 ± 31.07	269.62 ± 30.46
Final body weight (g)	303.75 ± 27.14 ^a	296.13 ± 31.04 ^a	275.88 ± 30.55 ^a	292.88 ± 28.23 ^a
Absolute liver weight (g)	9.09 ± 0.60 ^c	8.64 ± 0.63 ^c	10.60 ± 0.72 ^a	9.78 ± 0.39 ^b
Relative liver weight (g) (g/100 g b.w.)	3.00 ± 0.12 ^c	2.93 ± 0.14 ^c	3.76 ± 0.32 ^a	3.36 ± 0.26 ^b
Absolute kidney weight (g)	1.50 ± 0.18 ^c	1.54 ± 0.07 ^{bc}	1.83 ± 0.10 ^a	1.67 ± 0.09 ^b
Relative kidney weight (g/100 g b.w.)	0.49 ± 0.03 ^c	0.52 ± 0.03 ^c	0.67 ± 0.04 ^a	0.57 ± 0.03 ^b
Absolute brain weight (g)	1.23 ± 0.08 ^a	1.20 ± 0.06 ^a	1.26 ± 0.13 ^a	1.22 ± 0.05 ^a
Relative brain weight (g/100 g b.w.)	0.41 ± 0.05 ^b	0.41 ± 0.03 ^b	0.46 ± 0.08 ^a	0.42 ± 0.03 ^{ab}
Absolute testis weight (g)	3.22 ± 0.26 ^a	3.02 ± 0.34 ^a	3.28 ± 0.36 ^a	3.13 ± 0.31 ^a
Relative testis weight (g/100 g b.w.)	1.06 ± 0.08 ^b	1.03 ± 0.12 ^b	1.16 ± 0.11 ^a	1.07 ± 0.06 ^{ab}

Values are mean ± SD for groups of 8 animals each. Means that do not share a letter are significantly different.

Table 2: Hematological parameters of control male rats, treated with quercetin, metribuzin and quercetin co-administrated with metribuzin, after 3 weeks of treatment.

Experimental Groups				
Parameters	Control	Que	Mtz	Mtz + Que
RBC (× 10 ⁶ /ul)	9.15 ± 0.75 ^a	9.06 ± 0.74 ^a	7.58 ± 2.16 ^b	8.91 ± 1.12 ^{ab}
Hb (g/dl)	16.14 ± 1.00 ^a	15.44 ± 0.96 ^a	12.85 ± 3.95 ^b	14.81 ± 1.55 ^{ab}
HCT (%)	45.77 ± 3.42 ^a	43.51 ± 3.61 ^a	34.82 ± 9.65 ^b	41.15 ± 3.01 ^a
MCV (fl)	50.62 ± 4.56 ^a	48.25 ± 5.28 ^a	46.5 ± 1.93 ^a	47.12 ± 3.98 ^a
MCH (pg)	17.81 ± 1.11 ^a	16.96 ± 1.03 ^a	16.85 ± 0.96 ^a	16.92 ± 1.06 ^a
MCHC (g/dl)	35.31 ± 1.75 ^a	35.66 ± 2.00 ^a	36.2 ± 2.60 ^a	36.05 ± 2.07 ^a

Values are mean ± SD for groups of 8 animals each. Means that do not share a letter are significantly different.

Table 3: Changes of biochemical parameters of control rats, treated with quercetin, metribuzin and quercetin co-administrated with metribuzin, after 3 weeks of treatment.

Experimental Groups				
Parameters	Control	Que	Mtz	Mtz + Que
Glucose (mg/dl)	107.25 ± 6.09 ^b	101.87 ± 4.29 ^c	114.5 ± 2.20 ^a	108.5 ± 5.10 ^b
Urea (mg/dl)	39.5 ± 6.70 ^c	36.62 ± 3.78 ^c	56.62 ± 7.59 ^a	45.87 ± 2.64 ^b
Creatinine (mg/dl)	0.49 ± 0.08 ^{bc}	0.42 ± 0.06 ^c	0.85 ± 0.10 ^a	0.57 ± 0.08 ^b
Cholesterol (g/l)	0.96 ± 0.13 ^{bc}	0.85 ± 0.07 ^c	1.24 ± 0.18 ^a	1.06 ± 0.12 ^b
Triglycerides (g/l)	0.95 ± 0.08 ^{bc}	0.93 ± 0.14 ^c	1.12 ± 0.09 ^a	1.03 ± 0.06 ^{ab}
Total protein (g/l)	71.75 ± 4.12 ^a	71.73 ± 4.34 ^a	65.27 ± 5.41 ^b	69.84 ± 3.08 ^a



Total bilirubin (mg/l)	5.10 ± 0.60 ^{bc}	4.76 ± 0.58 ^c	7.24 ± 0.91 ^a	5.73 ± 0.42 ^b
AST (U/L)	79.62 ± 5.83 ^b	83.37 ± 5.95 ^b	90.87 ± 4.85 ^a	84.37 ± 5.88 ^b
ALT (U/L)	31.37 ± 4.93 ^b	34.75 ± 4.77 ^b	44.12 ± 7.64 ^a	36.87 ± 5.25 ^b
ALP (U/L)	145.12 ± 9.33 ^b	142.25 ± 7.92 ^b	224.62 ± 49.14 ^a	156.75 ± 6.88 ^b

Values are mean ± SD for groups of 8 animals each. Means that do not share a letter are significantly different.

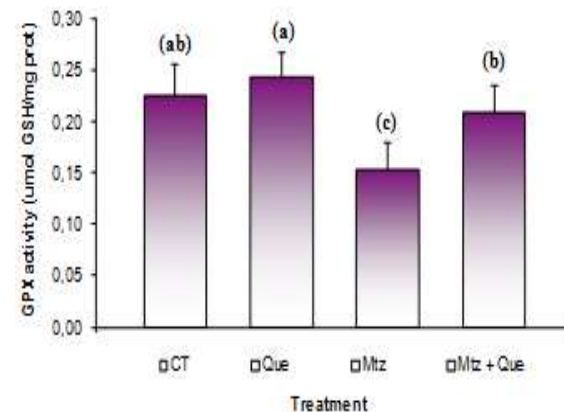
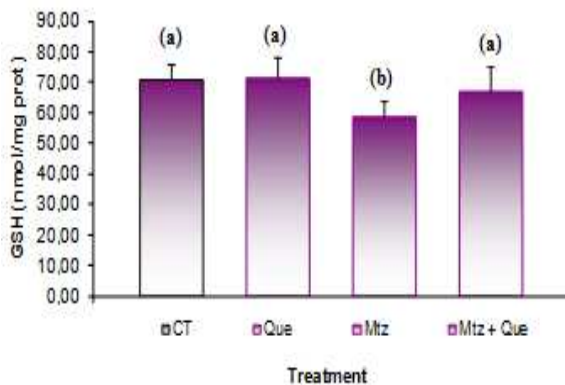
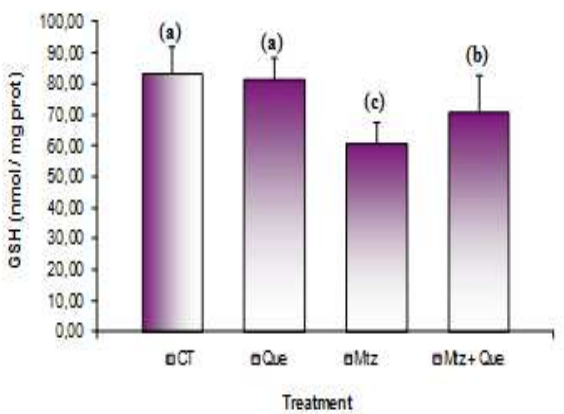
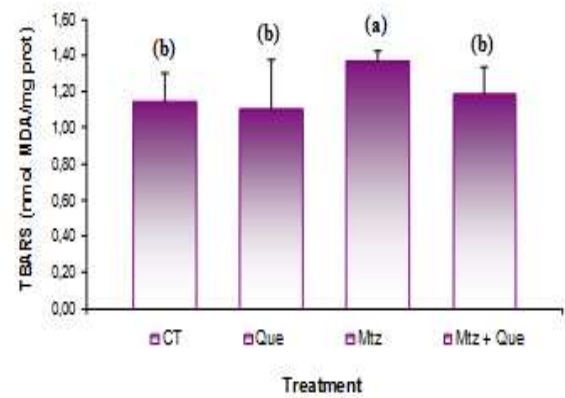
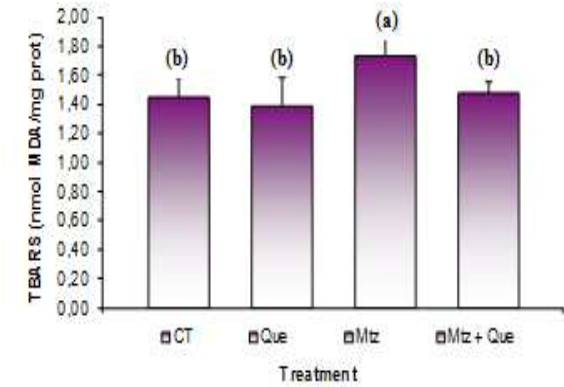


Figure 1: Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS, nanomoles of MDA per milligram of protein), reduced glutathione (nanomoles per milligram of protein) and glutathione peroxidase activity in liver of control (CT) and rats treated with quercetin (Que), metribuzin (Mtz) and Que co-administrated with Mtz after 3 weeks of treatment. Values are given as mean ± SD for groups of 8 animals each. Means that do not share a letter are significantly different.

Figure 2: Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS, nanomoles of MDA per milligram of protein), reduced glutathione (nanomoles per milligram of protein) and glutathione peroxidase activity in kidney of control (CT) and rats treated with quercetin (Que), metribuzin (Mtz) and Que co-administrated with Mtz after 3 weeks of treatment. Values are given as mean ± SD for groups of 8 animals each. Means that do not share a letter are significantly different.

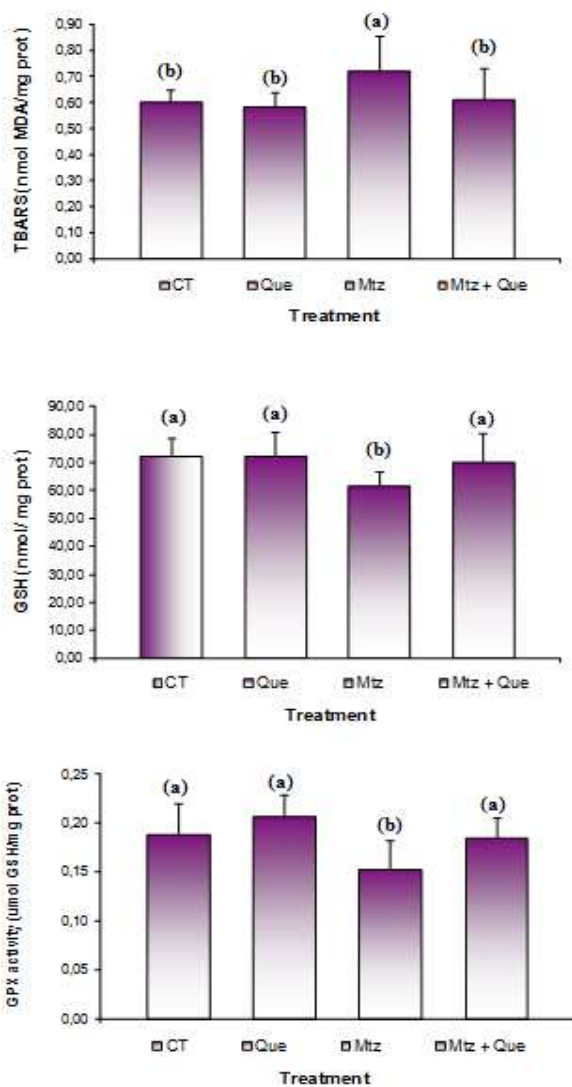


Figure 3: Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS, nanomoles of MDA per milligram of protein), reduced glutathione (nanomoles per milligram of protein) and glutathione peroxidase activity in brain of control (CT) and rats treated with quercetin (Que), metribuzin (Mtz) and Que co-administrated with Mtz after 3 weeks of treatment. Values are given as mean \pm SD for groups of 8 animals each. Means that do not share a letter are significantly different.

DISCUSSION

Free radicals have become an attractive means to explain the toxicity of numerous xenobiotics e.g. pesticides.²⁸

In fact, certain pesticides may increase the production of (ROS) and, therefore, induce oxidative stress in non-target species.²⁹ However, antioxidants can play a crucial role in offering protection against pesticide induced oxidative damage.³⁰

The findings of the present study clearly revealed the protective nature of quercetin against metribuzin-induced oxidative stress in rats.

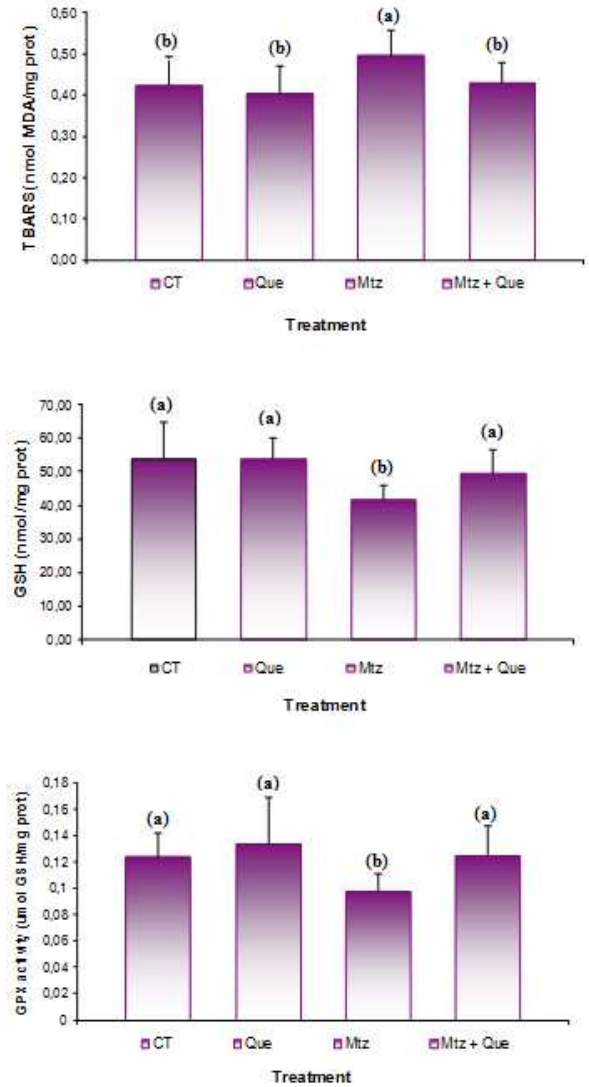


Figure 4: Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS, nanomoles of MDA per milligram of protein), reduced glutathione (nanomoles per milligram of protein) and glutathione peroxidase activity in testis of control (CT) and rats treated with quercetin (Que), metribuzin (Mtz) and Que co-administrated with Mtz after 3 weeks of treatment. Values are given as mean \pm SD for groups of 8 animals each. Means that do not share a letter are significantly different.

Metribuzin exposure has changed absolute and relative weights of liver, kidney, brain and testis; leading to the alterations in organ-body weight ratio in this toxicity study. The significant increase in the absolute and relative weight of different vital organs may be an indication of adverse effects of subacute administration of metribuzin to experimental rats. Accordingly, all the morphological changes observed in metribuzin intoxicated rats were ameliorated by administering quercetin.

Further, the decrease in Hb concentration and RBCs count of Mtz-treated group might be due to the effect of pesticide on erythropoietic tissue. The poisoning by pesticide residues causes anemia which come from



reducing Hb biosynthesis and shortening the life span of circulating erythrocytes.³¹ The reduced Hb synthesis may be responsible for decreased erythrocytic counts resulting in decline of haematocrit values³². Our findings were supported with the data provided by Velisek³³ who noticed the decrease of RBC count, Hb concentration, and HCT % levels in fish after acute exposure to metribuzin. The lack of significant decrease of Hb, HCT and the concentration of RBCs recorded in-group co-treated with metribuzin and quercetin; when compared to the Mtz-treated group was an indication of the attenuation of Mtz-evoked anemia by the antioxidant quercetin. In fact, quercetin was able to protect red blood cells from oxidative damage³⁴, and its antioxidant effect on haematological parameters was documented *in vitro*³⁵⁻³⁰, and *in vivo*³⁶ experimental studies.

The rise in blood glucose might be an indication of disrupted carbohydrate metabolism due to enhanced breakdown of liver glycogen, possibly mediated by the increase in adrenocorticotrophic and glucagon hormones and/or reduced insulin activity³². Metribuzin-induced hyperglycemia has been also recorded in rats¹¹, and fish³³. The improved change in blood glucose in the group given Que as a protective could be due to the fact that Que can stimulate glucose uptake in peripheral tissues, increase hepatic glucokinase, augmenting both oxidation and storage of glucose and reducing hepatic gluconeogenesis and glycogenolysis because of its antidiabetic effects.³⁷

The elevation in serum urea and creatinine levels in Mtz-treated rats is considered as a significant marker of renal dysfunction¹¹, and it may be due to the effect of pesticides on liver function, as urea is the end product of protein catabolism³². While, the concentrations of serum creatinine and urea were reduced in rats that were administered a combination of (Mtz+ Que), which is an indication of renal protection by quercetin³⁸, that it was able to attenuate renal impairment³⁹.

An increase in the serum total cholesterol and triglycerides following exposure to metribuzin has been observed in this study. The elevation in the cholesterol level may be due to an increased cholesterol synthesis in the liver or it may be a sign of liver damage that can be attributed to the effect of pesticides on the permeability of liver cell membrane⁴⁰. The elevation in serum triglycerides has been attributed to an inhibition of the lipase enzyme activity of both the hepatic triglycerides and plasma lipoproteins⁴⁰. Similar hypercholesterolemia and hypertriglyceridemia have been observed in other studies of pesticide intoxication³¹⁻³². However, rats co-treated with quercetin along metribuzin reversed this condition; quercetin has been shown to have hypocholesterolaemic and hypotriacylglycerolaemic effects in animal studies⁴¹.

Administration of metribuzin to rats has induced liver toxicity as reflected by the elevation of liver damage marker enzymes like AST, ALT and ALP. The elevations of

these enzymes may be caused hepatocytes dysfunction with alteration of the liver membrane permeability⁴². The actual results are in resemblance with Chiali¹¹ who demonstrated that metribuzin administration can cause significant increases in hepatic transaminase activities associated with oxidative damage. Furthermore, the increase in serum total bilirubin of Mtz-treated rats may result from decreased liver uptake, conjugation or increased bilirubin production from hemolysis⁴⁰. The decrease in the levels of total proteins might be due to changes in protein synthesis and/or metabolism⁴⁰.

On the other hand, the current results indicated that metribuzin co-treated by quercetin had no significant effects on serum biochemical parameters of rat liver, corroborating the findings of Krishnappa⁴³ which have indicated that quercetin has shown significant prophylactic effects by restoring rat liver function markers (AST, ALT, ALP, serum bilirubin, and total protein) after CCl₄ administration. In addition to its antioxidant action, quercetin seems to protect liver and ameliorate its hepatic function³⁹, as evidenced in other study³⁸, is concordant with the present report.

Lipid peroxidation has been suggested as one of the molecular mechanisms involved in pesticide-induced toxicity²⁸. Malondialdehyde (MDA) level in Mtz treatment was significantly higher than that of the control. These indirectly suggest an increased production of oxygen free radicals in rat body. Highly reactive oxygen metabolites, especially hydroxyl radicals, act on membrane unsaturated fatty acids of phospholipid components to produce malondialdehyde, a lipid peroxidation product²⁸. In other word, tissue MDA levels of all organs were decreased in-group treated by metribuzin plus quercetin, which may be related to the ability of quercetin to inhibit lipid peroxidation, because of its capacity to scavenge oxygen free radicals¹⁹.

Subacute exposure to metribuzin (1/20 LD50) resulted in a decrease of glutathione levels and disturbance in the activities of GPx enzymes of liver, kidney, brain and testicular tissues. Decrease in GSH levels were also observed in the study of Chiali¹¹ who suggested that the reduced levels of GSH in treated rats could be the result of increased utilization of GSH for conjugation and/or its participation as an antioxidant against free radicals induced by metribuzin toxicity.

Additionally, the corresponding diminution in the activity of GPx is consistent with the data provided by Sharma⁴⁴ who indicated that the decrement in GPx level in rats treated by cypermethrin pesticide might come from the decrease in GSH level as the latter is used as substrate of GPx, therefore a decreased GSH levels showed in these results confirmed this theory. Moreover, a reduction in the oxidative damage was observed in metribuzin-quercetin group, with elevation in the level of GSH and enzymatic antioxidant (GPx), which may be due to the fact that quercetin can reduce the consumption of GSH and the enzymatic antioxidants under oxidative stress



condition.³⁰ In support of the present findings, other studies proved the protective effect of quercetin on enzymatic antioxidant system⁴³, and the nonenzymatic antioxidants as GSH³⁸.

In conclusion, the present study showed that Que has considerable cytoprotective outcome against Mtz induced oxidative damage. Such protection is likely attributed to its antioxidant properties by scavenging the toxic generated free radicals.

Acknowledgement: The present research was supported by the Algerian Ministry of Higher Education and Scientific Research, Directorate General for Scientific Research and Technological Development through the Research Laboratory “Laboratory of Biochemical and Environmental Toxicology” Faculty of Sciences, University of Badji Mokhtar, Annaba, Algeria.

REFERENCES

- Kumar V, Kumar V, Upadhyay N, Sharma S. Chemical, biochemical and environmental aspects of atrazine, J. Bio. & Env. Sci, 5, 2014, 149-165.
- Dbira S, Bedoui A, Bensalah N. Investigations on the degradation of triazine herbicides in water by photo-fenton process, American Journal of Analytical Chemistry, 5, 2014, 500-517.
- Hamza RZ, Abd El-Azez AM, Hussien NA. Evaluation of the antioxidant potential for different extracts of al-taif pomegranate (*punica granatum L*) induced by atrazine and malathion pesticides in liver of male albino mice, Int J Pharm Pharm Sci, 7, 2015, 89-94.
- Salman AS, Farghaly AA, Donya SM, Shata F. Protective effect of cinnamomum camphora leaves extract against atrazine induced genotoxicity and biochemical effect on mice, Journal of American Science, 8, 2012.
- El Sayed EM, Prasher SO. Effect of the presence of nonionic surfactant brij35 on the mobility of metribuzin in soil, Appl.Sci, 3, 2013, 469-489.
- Mehdizadeh M. High performance liquid chromatographic determination of an asymmetrical triazine herbicide from soil, Intl J Farm & Alli Sci, 3, 2014, 1201-1205.
- Medjdoub A, Merzouk SA, Merzouk H, Chiali FZ, Narce M. Effects of mancozeb and metribuzin on *in vitro* proliferative responses and oxidative stress of human and rat spleen lymphocytes stimulated by mitogens, Pesticide Biochemistry and Physiology, 101, 2011, 27-33.
- Maksymiv IV, Husak VV, Mosiichuk NM, Matviishyn TM, Sluchyk IY, Storey JM, Storey KB, Lushchak VI. Hepatotoxicity of herbicide Sencor in goldfish may result from induction of mild oxidative stress, Pesticide Biochemistry and Physiology, 122, 2015, 67-75.
- Štěpánová S, Doleželová P, Plhalová L, Prokeš M, Maršálek P, Škoric M, Svobodová Z. The effects of metribuzin on early life stages of common carp (*Cyprinus carpio*), Pesticide Biochemistry and Physiology, 103, 2012, 152-158.
- Environmental Protection Agency, Health effects support document for metribuzin, 2003.
- Chiali FZ, Merzouk H, Merzouk SA, Medjdoub A, Narce M. Chronic low level metribuzin exposure induces metabolic alterations in rats, Pesticide Biochemistry and Physiology, 106, 2013, 38-44.
- Otuechere CA, Abarikwu SO, Rufai MA, Ohiozoje AE, Martins E, Farombi EO. Protective effects of vitamin C against propanil-induced hepatotoxicity in wistar rats, Asian Pacific Journal of Tropical Disease, 2, 2012, S212-S217.
- Madkour NK. Protective effect of curcumin on oxidative stress and DNA fragmentation against lambda cyhalothrin-induced liver damage in rats, Journal of Applied Pharmaceutical Science, 2, 2012, 076-081.
- Bouayed J, Bohn T. Exogenous antioxidants—Double-edged swords in cellular redox state, Health beneficial effects at physiologic doses versus deleterious effects at high doses, Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 3, 2010, 228-237.
- Mahajan M, Yadav SK. Effect of quercetin and epicatechin on the transcript expression and activity of antioxidant enzymes in tobacco seedlings, Global J. Biotech. & Biochem, 7, 2012, 19-25.
- Gabrielska J, Soczyńska-Kordala M, Przetalski S. Quercetin reduces prooxidant action of organometallic compounds on liposome membranes irradiated with UV, Polish Journal of Environmental Studies, 13, 2004, 509-514.
- Bouhali IE, Tayaa H, Ouakid ML, Tahraoui A. Quercetin, a natural flavonoid, alleviates fenthion induced anxiety-like behavior and depression signs in male wistar rat, Adv. Biores, 5, 2014, 110-115.
- Jamshidzadeh A, Rezaeian Mehrabadi A. Protective effect of quercetin on oxidative stress in glucose-6-phosphate dehydrogenase-deficient erythrocytes in vitro, IJPR, 9, 2010, 169-175.
- Ogundajo A, Imoru J, Kade I, Olawoye T. Quercetin elevates antioxidant status and modulates ouabain-sensitive transmembrane sodium pump in rat brain, The Pharma Innovation Journal, 3, 2014, 69-75.
- Wang H, Li S, Qi L, Xu W, Zeng Y, Hou Y, Zhao X. Metabonomic analysis of quercetin against the toxicity of chronic exposure to low-level dichlorvos in rats via ultra-performance liquid chromatography–mass spectrometry, Toxicology Letters, 225, 2014, 230-239.
- Xhaxhiu K, Shllaku J, Sula L, Xhelaj A, Kota T. The removal of metribuzin from pesticide contaminated waters using natural and activated prrenjasi-clay, NATURA MONTENEGRINA, Podgorica, 12, 2013, 505-519.
- De Oliveira CR, Ceolin J, De Oliveira RR, Schemitt EG, Colares JR, Bauermann LDF, Costabeber IH, Morgan-Martins MI, Mauriz JL, Silva JD, Reyes JM, Marroni NP. Effects of quercetin on polychlorinated biphenyls-induced liver injury in rats, Nutr Hosp, 29, 2014, 1141-1148.
- Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation, Methods in Enzymology, 105, 1984, 302-310.
- Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups, Archives of Biochemistry and Biophysics, 82, 1959, 70-77.
- Jollow DJ, Mitchell JR, Zampaglione Z, Gillette JR. Bromobenzene induced liver necrosis. Protective role of glutathione and evidence for 3,4-bromobenzene oxide as



- the hepatotoxic metabolites, *Pharmacology*, 11, 1974, 51-157.
26. Flohe L, Gunzler WA. Analysis of glutathione peroxidase, *Methods in Enzymology*, 105, 1984, 114-121.
27. Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantities of microgram quantities of protein utilizing the principle of proteinbinding, *Analytical Biochemistry*, 72, 1976, 248-254.
28. Abbassy MA, Marzouk MA, Mansour SA, Shaldam HA, Mossa ATH. 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, 2014, 218.
29. Larsen K, Najle R, Lifschitz A, Virkel G. Effects of sub-lethal exposure of rats to the herbicide glyphosate in drinking water: glutathione transferase enzyme activities, levels of reduced glutathione and lipid peroxidation in liver, kidneys and small intestine, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 34, 2012, 811-818.
30. Ashar Waheed MP, Muthu Mohammed HS. Fenvalerate-induced oxidative stress in erythrocytes and the protective role of quercetin, *Int.J.PharmTech Res*, 4, 2012, 1078-1083.
31. Yassa VF, Girgis SM, Abumourad IMK. Potential protective effects of vitamin E on diazinon-induced DNA damage and some haematological and biochemical alterations in rats, *Journal of Mediterranean Ecology*, 11, 2011, 31-39.
32. Mehra BL, Sharma P, Kaushik U, Joshi SC. Effect of fytolan on haematology and serum parameters of male albino rats, *International Journal of Pharma Research and Health Sciences*, 2, 2014, 332-338.
33. Velisek J, Svobodova Z, Piackova V, Novotny L, Blahova J, Sudova E, Maly V. Effects of metribuzin on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Veterinarni Medicina*, 53, 2008, 324-332.
34. Baş H, Kalender S, Pandir D. *In vitro* effects of quercetin on oxidative stress mediated in human erythrocytes by benzoic acid and citric acid, *Folia Biologica (Kraków)*, 62, 2014, 59-66.
35. Henneberg R, Otuki MF, Ferreira Furman AE, Hermann P, Do Nascimento AJ, Soares Leonart MS. Protective effect of flavonoids against reactive oxygen species production in sickle cell anemia patients treated with hydroxyurea, *Rev Bras Hematol Hemoter*, 35, 2013, 52-5.
36. Mladenović JM, Paunović MG, Matić MM, Knežević VS, Ognjanović BI, Štajn AS, Saičić AS. Copper-induced changes of lipid peroxidation and hemato-biochemical parameters in rat blood: protective role of flavonoids, *Arch. Biol. Sci., Belgrade*, 66, 2014, 1271-1279.
37. Gomes IB, Porto ML, Santos MCL, Campagnaro BP, Pereira TM, Meyrelles SS, Vasquez EC. Renoprotective, anti-oxidative and anti-apoptotic effects of oral low-dose quercetin in the C57BL/6J model of diabetic nephropathy, *Lipids in Health and Disease*, 13, 2014, 184.
38. Olayinka ET, Ore A, Ola OS, Adeyemo OA. Protective effect of quercetin on melphalan-induced oxidative stress and impaired renal and hepatic functions in rat, *Chemotherapy Research and Practice*.
39. Seiva FRF, Chuffa LGA, Braga CP, Amorim JPA, Fernandes AAH. Quercetin ameliorates glucose and lipid metabolism and improves antioxidant status in postnatally monosodium glutamate-induced metabolic alterations, *Food and Chemical Toxicology*, 50, 2012, 3556-3561.
40. El-Demerdash FM, Nasr HM. 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, 2014, 89-93.
41. Eger S, Bosy-Westphal A, Seiberl J, Kürbitz C, Settler U, Plachta-Danielzik S, Wagner AE, Frank J, Schrezenmeir J, Rimbach G, Wolfram S, Müller MJ. Quercetin reduces systolic blood pressure and plasma oxidised low-density lipoprotein concentrations in overweight subjects with a high-cardiovascular disease risk phenotype: a double-blinded, placebo-controlled cross-over study, *British Journal of Nutrition*, 102, 2009, 1065-1074.
42. Khalil SM, Taha KM, Farid HE, Atia AF. Antioxidant role of olive "Olea europeavar picual" leaves extract on profenofos induced oxidative stress in male rats, *International Journal of Advanced Research*, 2, 2014, 635-650.
43. Krishnappa P, Venkatarangiah K, Venkatesh, Shivamogga Rajanna SK, Prakash Gupta RK. Antioxidant and prophylactic effects of *Delonix elata* L., stem bark extracts, and flavonoid isolated quercetin against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats, *BioMed Research International*.
44. Sharma P, Huq AU, Singh R. Cypermethrin induced reproductive toxicity in male wistar rats: protective role of *Tribulus terrestris*, *Journal of Environmental Biology*, 34, 2013, 857-862.

Source of Support: Nil, Conflict of Interest: None.



AMELIORATIVE EFFECTS OF VANILLIN AGAINST METRIBUZIN-INDUCED OXIDATIVE STRESS AND TOXICITY IN RATS

LILIA KADECHE¹, EZZEDDINE BOUROGAA², MONGI SAOUDI², AMEL BOUMENDJEL¹, ASSIA DJEFFAL¹, ABDELFATTAH EL FEKI², MAHFOUD MESSARAH¹

¹Laboratory of Biochemistry and Environmental Toxicology, Faculty of Sciences, University of Badji Mokhtar, BP 12 Sidi Amar, Annaba, Algeria, ²Laboratory of Animal Ecophysiology, Faculty of Sciences, Sfax, Soukra road-Km 3.5, BP 802, 3018 Sfax, Tunisia
Email: mahfoud.messarrah@univ-annaba.dz

Received: 30 Jul 2016 Revised and Accepted: 05 Nov 2016

ABSTRACT

Objective: Vanillin (Va), a phenolic substance is a natural antioxidant with proven free radical scavenging activity and offers protection against oxidative damage. This study was designed to investigate the ameliorative effect of Va against metribuzin (Mtz) pesticide-induced toxicity and oxidative stress in rats.

Methods: Thirty-two rats were equally divided into four groups: control, vanillin (Va), metribuzin (Mtz) and metribuzin plus vanillin (Mtz+Va). Metribuzin (133.33 mg/kg, 1/20 LD₅₀) was given to rats through their drinking water. Vanillin was supplemented (150 mg/kg) intraperitoneally for three weeks. At the end of experiments, various haematological and biochemical parameters were estimated. Antioxidant defence systems as GPx enzyme activities, GSH and MDA contents were determined in tissues as the indicators of oxidative stress.

Results: Compared with the control, a significant decrease in the levels of red blood cells ($p \leq 0.05$), haemoglobin ($p \leq 0.003$) and hematocrit ($p \leq 0.02$) were noticed in the metribuzin-exposed group. The biochemical evaluation showed significantly higher values ($p \leq 0.0001$) for glucose, urea, creatinine and bilirubin. Also, Mtz treatment caused significant perturbations in lipids profile as plasma levels of total cholesterol ($p \leq 0.0001$) and triglycerides ($p \leq 0.004$). MDA levels increased in all the tissues of rats exposed to Mtz whereas the fluctuation in GPx enzyme activities and GSH levels were observed compared with controls. However, treatment with vanillin significantly normalised haematological profiles, serum biochemical profile and modulated all the oxidative stress parameters.

Conclusion: The use of vanillin appeared to be beneficial to rats, to a great extent in attenuating and restoring the damage sustained by metribuzin exposure.

Keywords: Metribuzin, Vanillin, Antioxidants, Oxidative stress, Pesticides

© 2017 The Authors. Published by Innovare Academic Sciences Pvt Ltd. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)
DOI: <http://dx.doi.org/10.22159/ijpps.2017v9i1.14258>

INTRODUCTION

Pesticides comprise a heterogeneous group of chemicals which are considered as one of the main factors involved in environmental contamination of today's world. These toxic chemicals designed to act as poison to the pests are able to produce devastating effects on intoxicating non-target organisms, including humans [1]. In fact, pesticides represent a major concern for human health and contribute significantly to many disease states including cancer, neurodegeneration and other chronic health effects [2]. Metribuzin (Mtz) a pesticide often used on vegetable crops to control broadleaf and grassy weed species [3] has also shown significant toxicity to humans [4] and animals [5, 3]. It has been reported that metribuzin is most likely to affect liver [3, 6], kidney [7], lipids profiles and blood chemistry [6]. Also, Velisek *et al.* [7] demonstrated that metribuzin has potentially induced hepatotoxicity *in vivo*.

Thus, it has been previously suggested that several pesticides exert their biological effects mainly through electrophilic attack of cellular constituents with simultaneous generation of reactive oxygen species (ROS) [8] which is a major cellular source of oxidative stress [9] and ultimately results in widespread oxidation of biomolecules includes lipids, proteins and nucleic acid [10]. The cytotoxic action of Mtz is also associated with the generation of ROS causing oxidative damage [3, 6].

To control the level of reactive oxygen species (ROS) and to protect cells under stress conditions, mammalian tissues contain several enzymatic (catalase CAT, superoxide dismutase SOD and glutathione peroxidase GPx) and non-enzymatic antioxidants (glutathione GSH), that scavenge ROS [11, 12]. Due to continuous exposure of pesticides, the level of these endogenous antioxidants decreases leading to accelerated cell death [11]. However, any compound,

natural or synthetic with antioxidant properties might contribute towards the partial or total alleviation of this type of damage [13, 14]. Antioxidants, both from natural and synthetic sources have proved to be highly effective to control the magnitude of free radicals production, to prevent its undesirable effects, as well as to support the organism antioxidant and detoxifying mechanisms [15].

Indeed, many plant extracts have been reported to have multiple biological effects including antioxidant properties [16]. Vanillin (4-hydroxy-3-methylbenzaldehyde) is a good example, which is a primary component of the vanilla bean extract [17]. It is one of the most widely used flavour components in beverage, food preservatives, cosmetics and drugs industry with an estimated annual worldwide consumption of more than 2000 tons [18] but the compound is mainly synthetically produced because the naturally derived product is expensive [17].

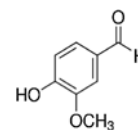


Fig. 1: Structure of vanillin

Besides its industrial and food application, this compound has been the subject of several scientific investigations in the last years, such as the identification of antioxidant properties, antimicrobial activity, as well as antimutagenic and anticarcinogenic actions. Part of these biological properties can be attributed to the fact that vanillin (fig. 1) is a phenolic compound [19].

To the best of our knowledge, no previous study of the efficacy of vanillin on pesticide toxicity has been reported. Therefore, the current study was designed to evaluate the protective effects of a synthetic antioxidant vanillin (Va) against oxidative damage in rats subacutely exposed to metribuzin (Mtz) pesticide.

MATERIALS AND METHODS

Drugs and chemicals

The commercial herbicide metribuzin (C₈H₁₄N₄O₅; CAS. Nos metribuzin 21087-64-9) used in this study was obtained from (INRAA, Algeria). It was tested in the form of Sencor WP 70 pesticide, of which the active substance was metribuzin in the amount of 70%. All other reagents used were of high quality and analytical grade. Vanillin [IUPAC name 4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde, chemical formula (CH₃O) (OH) C₆H₃CHO, the molecular weight of 152.15] was obtained from Hi-Media laboratories.

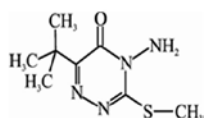


Fig. 2: Structural formula of metribuzin

Animals

A total of 32 male Wistar rats weighing approximately 200–250 g were used for this experiment. They were procured from the Pasteur Institute (Algiers, Algeria). Rats were maintained under standard conditions of temperature (22±2 °C), humidity (40%) and photoperiod. Food (standard diet, supplied by the ONAB, Algiers, Algeria) and water were available ad-libitum. After two weeks of acclimatisation, rats were divided among the control and test groups. All experiments were carried out in accordance with ethical approval.

Experimental design

Animals were randomly divided into 4 groups (8 rats in each):

Group I: Control group (C) rats received drinking water.

Group II (Va): Animals received vanillin dissolved in 0.9% saline solution and administered by intraperitoneal injection at a dose of 150 mg/kg body weight (in a volume of 1 ml/kg body weight).

Group III (Mtz): Rats given orally metribuzin at a dose of 133.33 mg/kg body weight (1/20 LD₅₀) in drinking water.

Group IV (Mtz+Va): Rats treated daily with both metribuzin and vanillin as in group two and three.

Rats in the group (C) and (Mtz) were daily given physiological saline (0.9% NaCl, 1 ml/kg body weight) by intraperitoneal injection (i. p.) during the whole course of the experiment.

Vanillin and metribuzin doses were based in previous studies [14] and [20] respectively. The treatment was continued for a period of three consecutive weeks, and all individuals were weighed one every week. At the end of the experiment, total body weights were recorded, and animals were sacrificed by decapitation without anaesthesia to avoid animals stress. Different organs namely liver, kidney, brain and testis were removed and weighed in order to obtain the relative weight of each organ (%) which was calculated as g/100g body weight.

Blood collection and haematological profile

At the time of sacrifice, blood samples for biochemical assays were collected in tubes without anticoagulant and serum was obtained by centrifugation of the samples for 15 min at (3000 rpm, 4 °C). Blood samples for haematological analysis were collected in tubes containing EDTA.

The haematological analysis was performed using an automatic haematological analyser (Auto Hematology Analyz, MODEL PCE-210N,

Japan). Haematological parameters evaluated were total red blood cell (RBC), haemoglobin (Hb) concentration, hematocrit (HCT), mean corpuscular haemoglobin (MCH), mean corpuscular volume (MCV) and mean corpuscular haemoglobin concentration (MCHC).

Tissue preparation

One gramme of liver, kidney, brain and testis was homogenised in 2 ml of buffer solution of phosphate buffer saline 1:2 (w/v; 1g tissue with 2 ml TBS, pH 7.4). Homogenates were centrifuged at 10000 x g for 15 min at 4 °C and the resultant supernatant was used for the determination of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), reduced glutathione (GSH) and protein levels in one hand and the estimation of GSH-Px activity in the other hand.

Biochemical profile

Different biochemical parameters were measured by spectrophotometric methods using the corresponding kits from Spin react (Spain, refs: glucose-1001190, triglycerides-41031, cholesterol-1001090, urea-1001331, creatinine-, bilirubin-1001044, total protein-1001291, (ALP) alkaline phosphatase-1001130–1001131, (AST) aspartate aminotransferase-1001160–1001161 and (ALT) alanine aminotransferase-1001170–1001171).

Determination of lipid peroxidation

The lipid peroxidation levels in liver, kidney, brain and testis homogenates were measured as malondialdehyde (MDA) which is the end product of lipid peroxidation and reacts with thiobarbituric acid (TBA) as a TBARS to produce a red-colored complex with a peak absorbance at 532 nm according to Buege and Aust [21]. Thus, 125 ml of supernatant were homogenised by sonication with 50 ml of PBS, 125 ml of trichloroacetic acid–butylhydroxytoluene in order to precipitate proteins and then centrifuged (1000 g, 10 min, 4 °C). Then, 200 ml of supernatant were mixed with 40 ml of HCl (0.6 M) and 160 ml of TBA dissolved in Tris and then the mixture was heated at 80 °C for 10 min. The absorbance of the resultant supernatant was obtained at 530 nm. The amount of MDA was calculated using a molar extinction coefficient of 1.56 × 10⁵ M/cm.

Reduced glutathione (GSH) levels

GSH level was estimated using a colorimetric technique, as mentioned by Jollow *et al.* [22]. This assay is based on the development of yellow colour when DTNB (5, 5' dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) is added to compounds containing sulfhydryl groups. In brief, 0.8 ml of liver supernatant was added to 0.3 ml of 0.25% sulfosalicylic acid and then tubes were centrifuged at 2500 x g for 15 min. Supernatant (0.5 ml) was mixed with 0.025 ml of 0.01 M DTNB and 1 ml phosphate buffer (0.1 M, pH 7.4). The absorbance at 412 nm was recorded. Finally, total GSH content was expressed as nmol GSH/mg protein.

Glutathione peroxidase (GPx) activity

Glutathione peroxidase (GPx) (E. C. 1.1.1.1.9) activity was measured by the procedure of Flohe and Gunzler [23]. Supernatant obtained after centrifuging 5% liver, kidney, brain and testis homogenate at 15000 x g for 10 min followed by 10.000 x g for 30 min at 4 °C was used for GPx assay. 1 ml of the reaction mixture was prepared which contained 0.3 ml of phosphate buffer (0.1 M, pH 7.4), 0.2 ml of GSH (2 mmol), 0.1 ml of sodium azide (10 mmol), 0.1 H₂O₂ (1 mmol) and 0.3 ml of liver supernatant. After incubation at 37 °C for 15 min, the reaction was terminated by addition of 0.5 ml 5% TCA. Tubes were centrifuged at 1500 x g for 5 min, and the supernatant was collected. 0.2 ml of phosphate buffer (0.1 M, pH 7.4) and 0.7 ml of DTNB (0.4 mg/ml) were added to 0.1 ml of reaction supernatant. After mixing, absorbance was recorded at 420 nm.

Protein assay

The protein content of tissues samples was measured by the method of Bradford [24], using bovine serum albumin as a standard.

Statistical analysis

Data were analysed using the statistical software MINITAB 16. Statistical analysis between all groups was performed with one-way

ANOVA followed by Fisher's LSD (Least Significant Difference) test to evaluate the significance of differences. All experimental data were expressed as means±standard deviation (SD). Means that do not share a letter are significantly different.

Results

Effects of treatments on body, absolute and relative weights

Table 1 shows the body, absolute and relative organ weights (liver, kidney, brain and testis) of the control and experimental groups. The significant changes occurred in the experimental groups when compared with the control. The body weight has increased progressively throughout the study in all the groups associated with marked growth retardation of the rats treated by metribuzin although there were no significant differences between them. A significant increase of Mtz treated group in relative liver (+25.33%), kidney (+36.73%), brain (+12.19%) and testis (+9.43%) weights was also recorded when compared with their respective control rats. However, vanillin supplementation reserved these changes after 3 w of treatment.

Effects of treatments on plasma haematological parameters

The results of a haematological profile in rats of control and treated group are presented in table 2. Animals treated with metribuzin had significant lower RBC count (-17.16%, $p < 0.05$), Hb (-20.38%, $p < 0.02$) and HCT (-23.92%, $p < 0.003$) compared to the control group. The mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular haemoglobin (MCH) and mean corpuscular haemoglobin concentration (MCHC) were not statically significant than that of the control. Whereas, in rats co-treated with vanillin, there were no significant changes in haematological parameters when compared with the control values.

Effects of treatments on plasma biochemical parameters

Data represented in table 3 show that oral treatment with metribuzin caused significant decrease (-9.03%, $p < 0.009$) in total

serum protein whilst a significant increase was noted in the level of glucose, urea, creatinine, bilirubin and cholesterol by (6.76, 43.34, 73.47, 41.96 and 29.17%; respectively) compared to the control ($p < 0.0001$). In addition, the activities of AST, ALT and ALP were significantly increased ($p < 0.006$, $p < 0.001$ and $p < 0.0001$) in metribuzin group compared to the control. In contrast, co-administration of vanillin to metribuzin treated animals restored most of these biochemical parameters to nearly normal levels.

Effects of treatments on lipid peroxidation

Results showed that metribuzin treatment caused significant increases of MDA levels (fig. 3, 4, 5 and 6) in all tissue tested, liver (+19.31%, $p < 0.0001$), kidney (+19.13%, $p < 0.007$), brain (+20%, $p < 0.02$) and testis (+19.05%, $p < 0.003$) when compared with their respective controls. Vanillin administered at 150 mg/kg to rats of (Mtz+Va) group alleviated lipid peroxidation and modulated significantly the levels of MDA in liver, kidney, brain and testis.

Effects of treatments on reduced glutathione contents

Data concerning liver, kidney, brain and testis reduced glutathione contents are presented in fig. 3, 4, 5 and 6. In Mtz group, statistically, significant differences were observed in liver (-27.43, $p < 0.0001$), kidney (-17.7%, $p < 0.0001$), brain (-14.59%, $p < 0.03$) and testis (-22.97, $p < 0.02$) compared to controls. Administration of vanillin improved liver, kidney, brain and testis reduced glutathione levels in (Mtz+Va) group compared to those of Mtz group.

Effects of treatments on glutathione peroxidase activity

Data of glutathione peroxidase activity measured in liver, kidney, brain and testis are presented in fig. 3, 4, 5 and 6. Administration of Mtz for 21 consecutive days induced significant decreases in GPX activity of liver (-34.78%, $p < 0.0001$), kidney (-18.75%, $p < 0.005$), brain (-21.05, $p < 0.02$) and testis (-16.67%, $p < 0.001$) compared to the controls. However, co-administration of vanillin with Mtz ameliorated GPx activity.

Table 1: Effect of metribuzin and its combination with vanillin on body weight, absolute and relative organ (liver, kidney, brain and testis) weights

Parameters	Control	Va	Mtz	Mtz +Va
Initial body weight (g)	266.62±33.36	267.75±31.67	266.37±31.07	270.88±25.56
Final body weight (g)	303.75±27.14 ^a	298.38±28.72 ^a	275.88±30.55 ^a	293.63±29.07 ^a
Absolute liver weight (g)	9.09±0.60 ^{bc}	8.57±1.02 ^c	10.60±0.72 ^a	9.70±0.51 ^b
Relative liver weight (g) (g/100 g b.w.)	3.00±0.12 ^c	2.87±0.14 ^c	3.76±0.32 ^a	3.32±0.21 ^b
Absolute kidney weight (g)	1.50±0.18 ^c	1.52±0.07 ^{bc}	1.83±0.10 ^a	1.63±0.09 ^b
Relative kidney weight (g/100 g b.w.)	0.49±0.03 ^c	0.51±0.03 ^c	0.67±0.04 ^a	0.56±0.03 ^b
Absolute brain weight (g)	1.23±0.08 ^a	1.22±0.09 ^a	1.26±0.13 ^a	1.21±0.04 ^a
Relative brain weight (g/100 g b.w.)	0.41±0.05 ^b	0.41±0.02 ^b	0.46±0.08 ^a	0.41±0.03 ^{ab}
Absolute testis weight (g)	3.22±0.26 ^a	3.20±0.49 ^a	3.28±0.36 ^a	3.07±0.15 ^a
Relative testis weight (g/100 g b.w.)	1.06±0.08 ^b	1.07±0.09 ^{ab}	1.16±0.11 ^a	1.03±0.10 ^b

Va: vanillin; Mtz: metribuzin, Values are mean±SD for groups of 8 animals each. ^{a-b-c}Means in a row without a common superscript letter are significantly different.

Table 2: Effect of metribuzin and its combination with vanillin on red blood cell (RBC), haemoglobin (Hb) concentration, haematocrit (HCT), mean corpuscular haemoglobin (MCH), mean corpuscular volume (MCV) and mean corpuscular haemoglobin concentration (MCHC)

Parameters	Control	Va	Mtz	Mtz +Va
RBC ($\times 10^6$ /ul)	9.15±0.75 ^a	9.25±1.13 ^a	7.58±2.16 ^b	9.13±0.75 ^a
Hb (g/dl)	16.14±1.00 ^a	15.86±1.65 ^a	12.85±3.95 ^b	15.48±0.98 ^a
HCT (%)	45.77±3.42 ^a	44.14±3.94 ^a	34.82±9.65 ^b	42.91±3.20 ^a
MCV (fl)	50.62±4.56 ^a	47.75±4.89 ^a	46.5±1.93 ^a	48.25±6.18 ^a
MCH (pg)	17.81±1.11 ^a	17.20±0.95 ^a	16.85±0.96 ^a	17.38±1.30 ^a
MCHC (g/dl)	35.31±1.75 ^a	35.96±2.55 ^a	36.2±2.60 ^a	35.66±2.71 ^a

Va: vanillin; Mtz: metribuzin, Values are mean±SD for groups of 8 animals each. ^{a-b}Means in a row without a common superscript letter are significantly different. Statistically significant differences from all the groups: (RBC, $p < 0.05$); (Hb, $p < 0.02$); (HCT, $p < 0.003$).

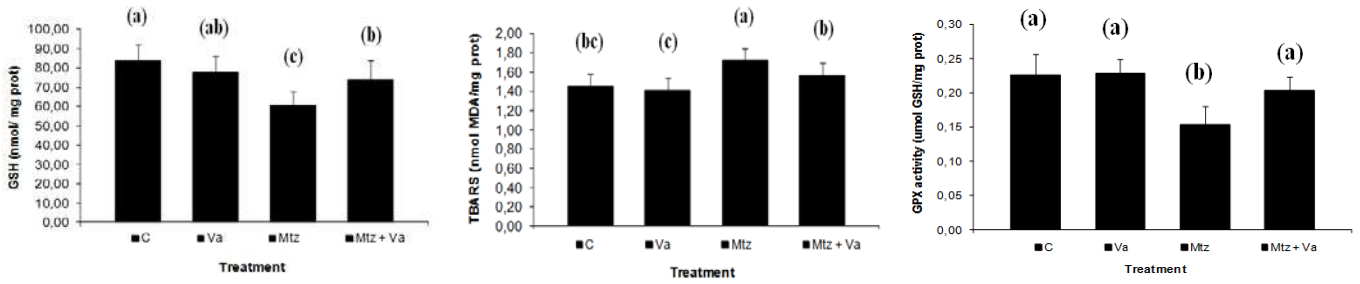


Fig. 3: Effect of metribuzin (Mtz) and its combination with vanillin (Va) on liver TBARS (nanomoles of MDA per milligramme of protein), reduced glutathione (nanomoles per milligramme of protein) and glutathione peroxidase activity. Values are given as mean±SD for groups of 8 animals each. ^{a-b-c}Means that do not share the same letter are significantly different. Significant differences from all the groups: (MDA, GSH and GPx; p ≤ 0.0001). TBARS: thiobarbituric acid reactive substances; MDA: malondialdehyde

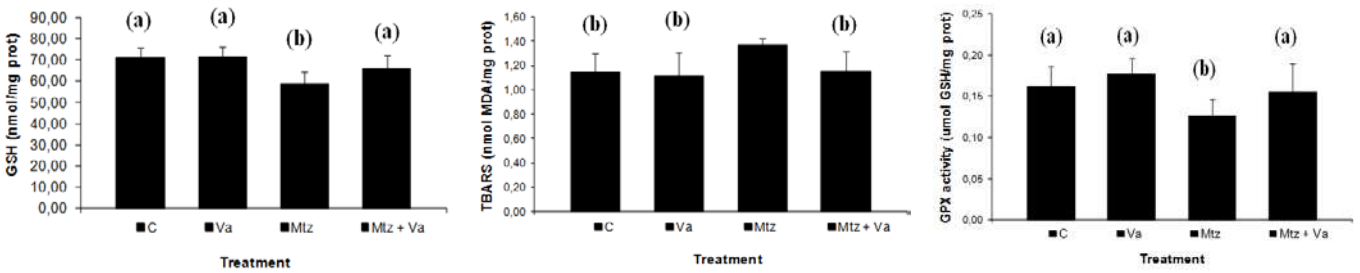


Fig. 4: Effect of metribuzin (Mtz) and its combination with vanillin (Va) on kidney TBARS (nanomoles of MDA per milligramme of protein), reduced glutathione (nanomoles per milligramme of protein) and glutathione peroxidase activity. Values are given as mean±SD for groups of 8 animals each. ^{a-b}Means that do not share the same letter are significantly different. Significant differences from all the groups: (MDA, p = 0.007) \neq (GSH, p ≤ 0.0001); (GPx, p ≤ 0.005). TBARS: thiobarbituric acid reactive substances; MDA: malondialdehyde

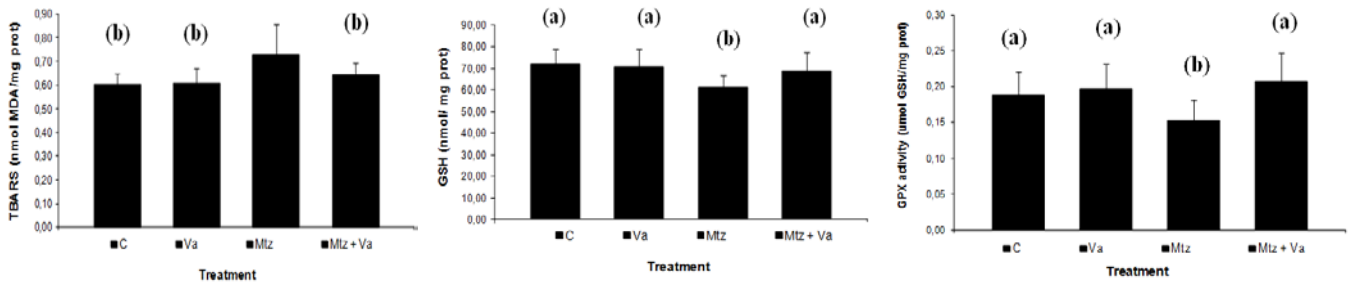


Fig. 5: Effect of metribuzin (Mtz) and its combination with vanillin (Va) on brain TBARS (nanomoles of MDA per milligramme of protein), reduced glutathione (nanomoles per milligramme of protein) and glutathione peroxidase activity. Values are given as mean±SD for groups of 8 animals each. ^{a-b}Means that do not share the same letter are significantly different. Significant differences from all the groups: (MDA and GPx, p ≤ 0.02); (GSH, p ≤ 0.03). TBARS: thiobarbituric acid reactive substances; MDA: malondialdehyde

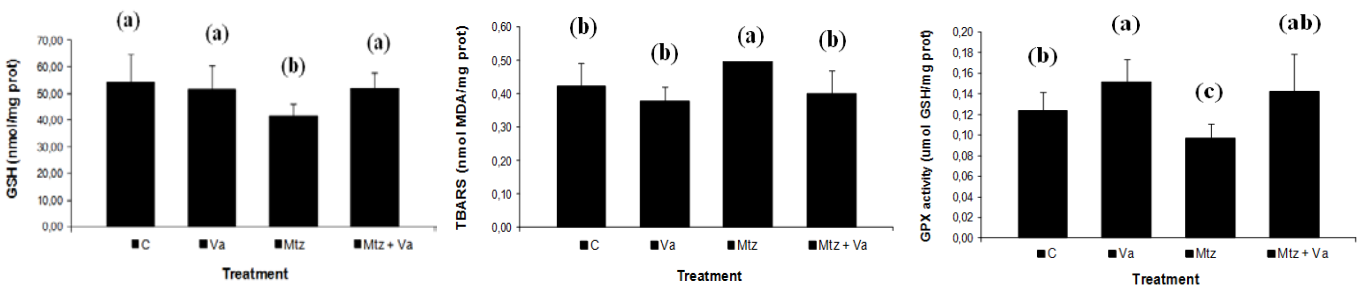


Fig. 6: Effect of metribuzin (Mtz) and its combination with vanillin (Va) on testis TBARS (nanomoles of MDA per milligram of protein), reduced glutathione (nanomoles per milligram of protein) and glutathione peroxidase activity. Values are given as mean±SD for groups of 8 animals each. ^{a-b-c}Means that do not share the same letter are significantly different. Significant differences from all the groups: (MDA, p ≤ 0.003); (GSH, p ≤ 0.02); (GPx, p ≤ 0.001). TBARS: thiobarbituric acid reactive substances; MDA: malondialdehyde

Table 3: Effect of metribuzin and its combination with vanillin on plasma glucose, total protein, bilirubin, blood urea, creatinine, aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT) and alkaline phosphatase (ALP)

Parameters	Control	Va	Mtz	Mtz +Va
Glucose (mg/dl)	107.25±6.09 ^{bc}	104.63±4.14 ^c	114.5±2.20 ^a	109.88±2.90 ^b
Urea (mg/dl)	39.5±6.70 ^b	37.63±4.24 ^b	56.62±7.59 ^a	42.38±4.07 ^b
Creatinine (mg/dl)	0.49±0.08 ^b	0.44±0.12 ^b	0.85±0.10 ^a	0.52±0.11 ^b
Cholesterol (g/l)	0.96±0.13 ^{bc}	0.94±0.12 ^c	1.24±0.18 ^a	1.10±0.11 ^b
Triglycerides (g/l)	0.95±0.08 ^b	0.91±0.13 ^b	1.12±0.09 ^a	0.98±0.13 ^b
Total protein (g/l)	71.75±4.12 ^a	72.23±3.36 ^a	65.27±5.41 ^b	70.07±3.44 ^a
Total bilirubin (mg/l)	5.10±0.60 ^b	4.92±0.31 ^b	7.24±0.91 ^a	5.43±0.79 ^b
AST (U/l)	79.62±5.83 ^b	82.12±7.94 ^b	90.87±4.85 ^a	83.00±5.29 ^b
ALT (U/l)	31.37±4.93 ^c	34.62±4.66 ^{bc}	44.12±7.64 ^a	38.00±4.75 ^b
ALP (U/l)	145.12±9.33 ^b	146.75±11.11 ^b	224.62±49.14 ^a	160.25±6.71 ^b

Va: vanillin; Mtz: metribuzin, Values are mean±SD for groups of 8 animals each. ^{a-b-c}Means in a row without a common superscript letter are significantly different. Statistically significant differences from all the groups: (glucose, urea, creatinine, cholesterol, bilirubin; $p \leq 0.0001$); (total protein, $p \leq 0.009$); (triglycerides, $p \leq 0.004$); (AST, $p \leq 0.006$); (ALT, $p \leq 0.001$); (ALP, $p \leq 0.0001$).

DISCUSSION

In the present study, the protective effect of vanillin against hematotoxicity, biochemical toxicity and oxidative damage induced by sub-acute exposure to metribuzin was undertaken.

After 21 d, main hematological response of rats to the sub-acute exposure of metribuzin was a decrease of RBCs, Hb and HCT values compared to the control group. The decrease in Hb concentration and RBCs count observed in this study may be due to the effect of pesticides on erythropoietic tissue. The poisoning by pesticide residues causes anemia which come from reducing Hb biosynthesis and shortening the life span of circulating erythrocytes [25]. The reduced Hb synthesis may be responsible for decreased erythrocytic counts resulting in decline of haematocrit values [26]. Similar changes in the haematocrit value, haemoglobin and erythrocyte counts were also reported by Velisek *et al.* [7] in fish following the acute poisoning with metribuzin.

Furthermore, treatment of rats with vanillin and metribuzin showed protective effects on haematological parameters. Corroborating with these results, the protective effects of other plant extracts against pesticide-induced hematotoxicity have been reported. For example, green tea protection against malathion-induced alteration of haematological parameters in rats was demonstrated in a study by Elzoghby *et al.* [9]. Dutta *et al.* [27] found that seed extract of *Pterocarpus santalinus* exerted beneficial effects.

Besides this, metribuzin exposure also brings some changes in the blood parameters. The results of our experimental study showed an increase in blood glucose levels after administration of metribuzin. The progressive accumulation of blood glucose revealed that rats exposed to Mtz became hyperglycemic which is in agreement with the findings of Chiali *et al.* [6] and Velisek *et al.* [7] who reported similar hyperglycemia in rat and fish treated with metribuzin. The rise in blood glucose produced by pesticides may indicate disrupted carbohydrate metabolism due to enhanced breakdown of liver glycogen, possibly mediated by increase in adrenocorticotrophic and glucagon hormones and/or reduced insulin activity [26].

While, vanillin supplementation effectively reduced the levels of blood glucose increased by Mtz exposure. As there are no scientific studies on its hypoglycemic activity, this case may be related to the biological effects of vanillin which are mainly attributed to the phenolic structure of such compound [18].

Plasma levels of urea and creatinine are important biomarkers of renal function in human and animal studies. An increase in the levels of these substances in the plasma is an indication of the loss of renal function [28]. Data from this study indicate that Mtz caused a significant increase in plasma urea and creatinine. This elevation may be due to kidneys damage caused by metribuzin. Also, Chiali *et al.* [6] reported that metribuzin can alter plasma urea and creatinine levels due to renal failure. Besides, similar observations have been reported in previous study following exposure to other pesticides [29, 30]. Many pesticides can cause some toxic and adverse effects

on the kidney tissues [9]. Therefore, the impairment in kidney function could probably occur via kidney oxidative damage [30].

However, in group treated by metribuzin plus vanillin there was a significant decrease of them when compared with metribuzin group. These results indicate that vanillin displays a remarkable protective effect on Mtz-induced renal damage which may be due to its antioxidant properties. So, a number of extracts of natural products and dietary antioxidants have been reported to show protective effects against nephrotoxicity. Overall, the findings suggest that the antioxidant properties of these compounds contribute significantly to its nephroprotective effect [31].

On the other hand, results from the serum lipid status of rats treated with Mtz showed significantly increased concentrations of serum cholesterol and triglyceride levels. Accordingly, El-Demerdasha and Nasr [32] also reported that pesticide increased plasma triglyceride levels which were attributed to an inhibition of the lipase activity of both the hepatic triglycerides and plasma lipoproteins. In addition, the increase in the level of serum cholesterol may be due to an increased cholesterol synthesis in the liver or it may be a sign of liver damage that can be attributed to the effect of pesticides on the permeability of liver cell membrane [32].

Interestingly, the observed results show that treatment of rats with vanillin caused apparent normalization in the total cholesterol and triglycerides levels. This is in accordance with the previous study where vanillin presented the reduction of cholesterol and triglyceride in the high-fat diet fed induced hyperlipidemic rats [33].

The activities of ALT, AST and ALP enzymes are the most sensitive biomarkers directly implicated in the extent of hepatic damage and toxicity [34]. In our findings, we demonstrated that Mtz administrated to rats provoked a marked elevation in serum AST, ALT and ALP activities which indicating hepatocellular damage as previously reported by Sief *et al.* [30] and Khalil *et al.* [35]. This elevation could potentially be attributed to the release of these enzymes from the cytoplasm into the blood circulation, indicating a necrosis and inflammatory reactions [34]. Regarding to total serum protein is the majority of serum proteins which are synthesized in the liver, so used as an indicator of liver impairment [9]. In the present work the rats administered metribuzin orally showed significant reduction in total protein which may be due to disturbance in protein synthesis in the liver due to hepatocytes dysfunction [9]. Also, the increase in serum total bilirubin of Mtz-treated rats may result from decreased liver uptake, conjugation or increased bilirubin production from hemolysis [32].

Moreover, these adverse effects were significantly attenuated by vanillin in the treatment group which indicated a prominent hepatoprotective effect of Va against metribuzin toxicity. In another study, the hepatoprotective effects by vanillin against CCl₄-induced liver damage were examined in male wistar albino rats [14]. It has been indicated that vanillin had significant anti-hepatotoxic activity and reducing the elevated levels of serum enzymes such as AST and ALT. Also, Makeni *et al.* [14] suggest that the hepatoprotective

mechanisms of vanillin could be attributed to the inhibition of inflammatory response in the liver.

Oxidative damage primarily occurs through production of reactive oxygen species including hydroxyl radicals and hydrogen peroxide that are generated during the reaction and react with biological molecules, eventually damaging membranes and other tissues [36]. Lipid peroxidation is a chemical mechanism capable of disrupting the structure and the function of the biological membranes that occurs as a result of free radical attack on lipids which was usually reflected by levels of MDA [37]. Therefore, it has used as biomarkers of pesticides induced oxidative stress and suggested as one of the molecular mechanisms involved in pesticides-induced toxicity [38]. From the other side, GSH is an important naturally occurring antioxidant which prevents free radical damage and helps detoxification by conjugating with chemicals. Also, it is central to the cellular antioxidant defences and acts as an essential cofactor for antioxidant enzymes including GPx [39].

The results of the present study indicated that sub-acute exposure to metribuzin induced oxidative stress in all tissues tested, as evidenced by elevated MDA levels, reduced GSH contents and decreased GPx activities. All these findings lead to the conclusion that the oxidative stress due to metribuzin may be ascribed to the induction of ROS production as evidenced by increased LPO levels, resulting in the depletion of GSH contents that could be the cause of decreased activity of GPx. These results were in line with previous studies which have shown that exposure to pesticide generates lipid peroxidation and alters the antioxidant status of several tissues in rats [38, 40, 41].

Moreover, a reduction in the oxidative damage was observed in metribuzin-vanillin group with elevation in the level of GSH and enzymatic antioxidant (GPx). This improvement may have resulted from vanillin provided a significant recovery in the level of ROS in metribuzin exposed animals in tissues. Indeed, vanillin presents different functional groups including the phenolic group. The antioxidant activity of phenols is attributed to their ability to scavenge free radicals [19]. So, like other polyphenols of its genre vanillin is a very potent free radical scavenger with ability for direct and specific scavenging of free radicals [42].

CONCLUSION

Our *in vivo* data shows that Va can be effectively used for application to overcome the oxidative damage induced by pesticide. Generally, vanillin presented ameliorative effect as rats receiving this phenolic in addition to metribuzin. Vanillin minimized the toxicity induced by metribuzin and its protective effect against oxidative damage could be explained by its antioxidant properties. Further studies on different animal and human models are essential to ensure the beneficial effects of vanillin. In addition, our findings show that Mtz may induce oxidative stress in some tissues and future histological studies are needed to confirm this finding.

ACKNOWLEDGMENT

The present research was supported by the Algerian Ministry of Higher Education and Scientific Research, Directorate General for Scientific Research and Technological Development through the Research Laboratory "Laboratory of Biochemical and Environmental Toxicology" Faculty of Sciences, University of Badji Mokhtar, Annaba, Algeria.

CONFLICT OF INTERESTS

Declared none

REFERENCES

- Magnarelli G, Fonovich T. Protein phosphorylation pathways disruption by pesticides. *ABC* 2013;3:460-74.
- Hernández AF, Lacasaña M, Gil F, Rodríguez-Barrancob M, Pla A, López-Guarnidoa O. Evaluation of pesticide-induced oxidative stress from a gene-environment interaction perspective. *Toxicology* 2013;307:95-102.
- Maksymiv IV, Husak VV, Mosiichuk NM, Matviishyn TM, Sluchyk IY, Storey JM, et al. Hepatotoxicity of herbicide sensor in goldfish may result from induction of mild oxidative stress. *Pestic Biochem Physiol* 2015;122:67-75.
- Medjdoub A, Merzouk SA, Merzouk H, Chiali FZ, Narce M. Effects of mancozeb and metribuzin on *in vitro* proliferative responses and oxidative stress of human and rat spleen lymphocytes stimulated by mitogens. *Pestic Biochem Physiol* 2011;101:27-33.
- Koutnik D, Stara A, Velisek J. The effect of selected triazines on fish: a review. *Slov Vet Res* 2015;52:107-31.
- Chiali FZ, Merzouk H, Merzouk SA, Medjdoub A, Narce M. Chronic low level metribuzin exposure induces metabolic alterations in rats. *Pestic Biochem Physiol* 2013;106:38-44.
- Velisek J, Svobodova Z, Piackova V, Novotny L, Blahova J, Sudova E, et al. Effects of metribuzin on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Vet Med* 2008;53:324-32.
- Al-Attar AM. Effect of grapeseed oil on diazinon-induced physiological and histopathological alterations in rats. *Saudi J Biol Sci* 2015;22:284-92.
- Elzoghby RR, Hamuoda AF, Abdel-Fatah A, Farouk M. Protective role of vitamin c and green tea extract on malathion-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity in rats. *Am J Pharmacol Toxicol* 2014;9:177-88.
- Zaki NI. Evaluation of profenofos intoxication in white rats. *Nat Sci* 2012;10:67-77.
- Ojo AO, Oyinloye BE, Ajiboye BO, Ojo AB, Akintayo CO, Okezie B. Dichlorvos induced nephrotoxicity in rat kidney: protective effects of *Alstonia boonei* stem bark extract. *Indian J Pharmacol* 2014;1:429-37.
- Newairy AA, Abdou HM. Effect of propolis consumption on hepatotoxicity and brain damage in male rats exposed to chlorpyrifos. *Afr J Biotechnol* 2013;12:5232-43.
- Suganya P, Nandhini R, Jayadoss T, Velavan S. *In vitro* antioxidant activity of methanolic extract of *Shorea robusta* in hepatocytes. *Int J Pharm Pharm Sci* 2014;6:227-30.
- Makni M, Chtourou Y, Fetoui H, Garoui EM, Boudawara T, Zeghal N. Evaluation of the antioxidant, anti-inflammatory and hepatoprotective properties of vanillin in carbon tetrachloride-treated rats. *Eur J Pharmacol* 2011;668:133-9.
- Martins N, Barros L, Ferreira ICFR. *In vivo* antioxidant activity of phenolic compounds: facts and gaps. *Trends Food Sci Technol* 2016;48:1-12.
- Raghavendra M, Madhusudhana Reddy A, Raghuvveer Yadav P, Sudharshan Raju A, Siva Kumar L. Comparative studies on the *in vitro* antioxidant properties of methanolic leafy extracts from six edible leafy vegetables of India. *Asian J Pharm Clin Res* 2013;6:96-9.
- Kim JH, Lee HO, Cho YJ, Kim J, Chun J, Choi J, et al. A vanillin derivative causes mitochondrial dysfunction and triggers oxidative stress in *Cryptococcus neoformans*. *PLoS One* 2014;9:e89122. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0089122>.
- Dhanalakshmi C, Manivasagam T, Nataraj J, Justin Thenmozhi A, Mohamed Essa M. Neurosupportive role of vanillin, a natural phenolic compound, on rotenone induced neurotoxicity in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *J Evidence-Based Complementary Altern Med* 2015. Doi:10.1155/2015/626028
- Oliveira CBS, Meurer YSR, Oliveira MG, Medeiros WMTQ, Silva FON, Brito ACF, et al. Comparative study on the antioxidant and anti-Toxoplasma activities of vanillin and its resorcinarene derivative. *Molecules* 2014;19:5898-912.
- Khaxhiu K, Shllaku J, Sula L, Xhelaj A, Kota T. The removal of metribuzin from pesticide contaminated waters using natural and activated porenjasi-clay. *Natura Montenegrina, Podgorica* 2013;12:505-19.
- Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 1984;105:302-10.
- Jollow DJ, Mitchell JR, Zampaglione Z, Gillette JR. Bromobenzene induced liver necrosis. Protective role of glutathione and evidence for 3,4-bromobenzene oxide as the hepatotoxic metabolites. *Pharmacology* 1974;11:51-17.
- Flohe L, Gunzler WA. Analysis of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* 1984;105:114-21.
- Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantities of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-54.
- Yassa VF, Girgis SM, Abumourad IMK. Potential protective effects of vitamin E on diazinon-induced DNA damage and

- some haematological and biochemical alterations in rats. J Mediterranean Ecol 2011;11:31-9.
26. Mehra BL, Sharma P, Kaushik U, Joshi SC. Effect of fytolan on haematology and serum parameters of male albino rats. Int J Pharma Res Health Sci 2014;2:332-8.
 27. Dutta K, Ali M, Najam A, Kumar R, Kumar A. Ameliorative effect of seed extract of *Pterocarpus santalinus* on coragen induced haematological alterations and serum biochemical changes in charles foster rats. J Toxicol Environ Health Sci 2014;6:194-202.
 28. Olayinka ET, Ore A. Hepatotoxicity, nephrotoxicity and oxidative stress in rat testis following exposure to haloxyfop-p-methyl ester, an aryloxyphenoxypropionate herbicide. Toxics 2015;3:373-89.
 29. Nazam N, Iqbal Lone M, Sharma M, Khan AA, Kelany AM, Ahmad W. Biochemical and cytoarchitectural evaluation of dimethoate intoxication in rat liver and kidney: an *in vivo* study. Indo Am J Pharm Res 2015;5:1127-37.
 30. Sief MM, Khalil FA, Abou Arab AAK, Abou Donia MA, El-Sherbiny AM, Mohamed SR. Ameliorative role of *Melissa officinalis* against hepatorenal toxicities of organophosphorus malathion in male rats. MOJ Toxicol 2015;1:00014. Doi:10.15406/mojt.2015.02.00014
 31. Rajagopal PL, Premaletha K, Kiron SS, Sreejith KR. A review on nephroprotective herbs and herbal formulations. Int J Pharm Chem Sci 2013;2:1888-1904.
 32. El-Demerdash FM, Nasr HM. Antioxidant effect of selenium on lipid peroxidation, hyperlipidemia and biochemical parameters in rats exposed to diazinon. J Trace Elem Med Biol 2014;28:89-93.
 33. Belagali Y, Ullal SD, Shoeb A, Bhagwath V, Ramya K, Maskeri R. Effect of vanillin on lipid profile in a model of hyperlipidemia, a preliminary study. Indian J Exp Biol 2013;51:288-91.
 34. Sidhu IPS, Bhatti JS, Bhatti GK. Modulatory action of melatonin against chlorpyrifos induced hepatotoxicity in Wistar rats. Asian J Med Sci 2014;2:123-31.
 35. Khalil SM, Taha KM, Farid HES, Atia AF. Antioxidant role of olive "*Olea europeavar picual*" leaves extract on profenofos induced oxidative stress in male rats. Int J Adv Res 2014;2:635-50.
 36. Heikal TM, Mossa ATH, Ibrahim AW, Abdel-Hamid HF. Oxidative damage and reproductive toxicity associated with cyromazine and chlorpyrifos in male rats: the protective effects of green tea. Res J Environ Toxicol 2014;8:53-67.
 37. Osama A, Fatma A, Mohamed EB, Huda S. Studies on the protective effects of ginger extract and in combination with ascorbic acid against aluminum toxicity induced hematological disorders, oxidative stress and hepatorenal damage in rats. AVAS 2014;15:137-50.
 38. Mossa ATH, Swelam ES, Mohafraash SMM. Sub-chronic exposure to fipronil induced oxidative stress, biochemical and histopathological changes in the liver and kidney of male albino rats. Toxicol Reports 2015;2:775-84.
 39. Sultana M, Prawez S, Ahmad Dar M, Ahmad M, Naseem S. Sub acute dermal toxicity of metalaxyl with special reference to oxidative stress in Wistar rats. Asian J Sci Technol 2015;6:1316-8.
 40. El-Kholy WM, Hemieda FAE, El-Zarif NA. Protective effect of aqueous extract of *Anacyclus pyrethrum* root on atrazine-induced male reproductive disorders in rats. Int J Adv Res 2015;3:1701-15.
 41. Ojo OA, Oyinloye BE, Ajiboye BO, Ojo AB, Musa H, Olarewaju OI. Dichlorvos-induced oxidative stress in rat brain: Protective effects of the ethanolic extract of *Alstonia boonei* stem bark. Asian J Pharm 2014;8:216-21.
 42. Al Asmari A, Al Shahrani H, Al Masri N, Al Faraidi A, Elfaki I, Arshaduddin M. Vanillin abrogates ethanol induced gastric injury in rats via modulation of gastric secretion, oxidative stress and inflammation. Toxicol Reports 2016;3:105-13.

How to cite this article

- Lilia Kadeche, Ezzeddine Bourogaa, Mongi Saoudi, Amel Boumendjel, Assia Djeflal, Abdelfattah El Feki, Mahfoud Messarah. Ameliorative effects of vanillin against metribuzin-induced oxidative stress and toxicity IN rats. Int J Pharm Pharm Sci 2017;9(1):56-62.

COMMUNICATIONS



6^{èmes} Journées Scientifiques de l'ATT «Processus Toxiques-Bioactivité-Biosurveillance»
Tabarka, 21-23 Janvier 2017

Attestation de Participation

Le comité d'organisation des 6^{èmes} Journées Scientifiques de l'ATT, tenues à
Tabarka du 21 au 23 Janvier 2017, atteste que *N.É. Kadeche...Li.lia*
a participé aux journées et a présenté une communication par affiche
n° *101*...

Le Secrétaire Général de l'ATT
Pr. Leila Chekir Ghedira

Assoc. Tunisienne
de Toxicologie
A.T.T.
الجمعية التونسية لدراسة السموم

Association Tunisienne de Toxicologie (ATT), Faculté de Médecine Dentaire, Rue Avicenne, 5019 Monastir.
Site web: www.attox.org Tél: + 21673425550, Fax: + 216 73461150



atp-be

Association Tunisienne de Physiologie
et de Biosurveillance de L'Environnement



Certificate of participation

We affirm that

Mr, Mrs : Lilia Kadeche

has presented a poster presentation entitled

« Effets préventifs des polyphénols sur la cytotoxicité induite par la métribuzine chez le rat wistar »

**At the 6th International Congress of Physiology and Environmental
Biomonitoring 18-21 December 2017, Douz, Tunisia**

